

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 251**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2013 PCT/US2013/042074**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013 WO13177198**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2013 E 13794410 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 2852399**

54 Título: **Péptidos de Ledgf y formulaciones de los mismos para el tratamiento de trastornos degenerativos**

30 Prioridad:

21.05.2012 US 201261649847 P
16.11.2012 WO PCT/US2012/065620

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.11.2020

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF COLORADO, A BODY CORPORATE (100.0%)
1800 Grant Street, 8th Floor
Denver, CO 80203, US

72 Inventor/es:

KOMPELLA, UDAY, B.;
BAID, RINKU;
UPADHYAY, ARUN, K. y
YANDRAPU, SARATH

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 791 251 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos de Ledgf y formulaciones de los mismos para el tratamiento de trastornos degenerativos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere, en general, a péptidos del factor de crecimiento derivado de epitelio del cristalino (LEDGF, por las siglas del inglés *lens epithelium derived grown factor*) y a composiciones de los mismos, para su uso en el tratamiento de enfermedades degenerativas y enfermedades con diversos estreses celulares entre las que se incluyen el estrés oxidativo y estrés por agregación de proteínas. Más específicamente, la presente invención se refiere a nuevas formulaciones de LEDGF₁₋₃₂₆ con mayor estabilidad y perfiles de suministro sostenidos y a su uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por la agregación de proteínas, enfermedades relacionadas con la edad y enfermedades degenerativas.

15 Antecedentes

Las enfermedades del segmento posterior del ojo que incluyen degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) y retinitis pigmentosa (RP), son las causas principales de ceguera en los Estados Unidos. (Jager et al., N ENGL J MED, 2008. 358(24): 2606-17). En la actualidad, cerca de 8 millones de personas padecen DMRE en los Estados Unidos y se espera que en el 2020 este número alcance los 12 millones. (Jager et al.; Friedman et al. Arch Ophthalmol, 2004. 122(4): págs. 564-72). La forma seca de la DMRE (DMRE seca) asociada al estrés oxidativo crónico y a la inflamación representa el 90 % de casos de DMRE. (Libby et al. Adv Exp Med Biol, 2010. 664: págs. 403-9; Stuenkel et al. JAMA, 2003. 294: págs. 8-14). Por otro lado, la RP es una enfermedad genéticamente hereditaria causada por más de 50 mutaciones genéticas diferentes. (Ohguro, H., et al., Nihon Ganka Gakkai Zasshi, 2002. 106(8): págs. 461-73; Dryja, et al., Nature, 1990. 343(6256): págs. 364-6.) Alrededor de 1,5 millones de personas en todo el mundo padecen actualmente RP. (Hartong, et al., Lancet, 2006. 368(9549): págs. 1795-809).

La anatomía y fisiología exclusivas del ojo es un obstáculo importante en el avance de los fármacos terapéuticos para la zona posterior del ojo, incluidas las enfermedades degenerativas de la retina. (Kompella et al., Ther Deliv. 1(3): págs. 435-56). Las vías de administración tópicas son ineficaces para suministrar fármacos a la zona posterior del ojo debido a la presencia de varias barreras estáticas (córnea, conjuntiva y esclerótica entre otros tejidos) y barreras dinámicas (parpadeo, película lagrimal, renovación lagrimal y lagrimeo inducido). (Gaudana, R., et al, Ocular drug delivery. Aaps J, 2010. 12(3): págs. 348-60; Thrimawithana et al. Drug Discov Today, 2011. 16(5-6): págs. 270-7). Por otro lado, la barrera hematorretiniana (BHR), la degradación sistémica, los efectos secundarios sistémicos y las bajas concentraciones en el lugar diana son los desafíos principales de la vía intravenosa. Otras vías, tales como la intracameral, periorcular, subretinal, tienen su propio subconjunto de problemas que comparten algunos aspectos en común con la vía de administración tópica y sistémica (Baid et al. Drug Development and the back of the eye. ed. Kompella UB. 2010, págs. 409-448: Springer). El suministro local, tal como una inyección intravítrea, coloca el fármaco cerca de la retina (el tejido diana de las enfermedades degenerativas de la retina) y, por tanto, es la vía más eficaz para el suministro de fármacos en la retina. Sin embargo, las inyecciones intravítreas frecuentes del fármaco provocan diversas complicaciones tales como desprendimiento de retina, hemorragia retiniana, endoftalmitis, aumento de la presión intraocular, y por no hablar del cumplimiento terapéutico por parte del paciente y las infecciones. (Peyman et al. Retina, 2009. 29(7): págs. 875-912; Wu et al. Semin Ophthalmol, 2009. 24(2): págs. 100-5). Por tanto, existe la necesidad de composiciones y de sistemas de suministro que puedan prolongar la retención de fármacos en el ojo.

Rinku Baid y colaboradores (Rinku Baid et al., "LEDGF1-326 decreases P23H and wild-type rhodopsin aggregates and P23H rhodopsin mediated cell damage in human retinal pigment epithelial cells", PLOS ONE, vol. 6(9), 1-14) desvelan una composición basada en un lisado celular que comprende el péptido de LEDGF1-326 y agua, aunque también otros principios tales como SDS. El SDS se utiliza como detergente en productos de limpieza e higiene, y también en el lisado de células; descartando su uso como excipiente, vehículo o diluyente en la preparación de una composición farmacéutica, que se va a administrar a animales o a seres humanos.

Ogawa y colaboradores (Ogawa Y et al., "Autoantigenicity of DFS70 is restricted to the conformational epitope of C-terminal alpha-helical domain", J. Autoimmunity, vol. 23(3), 221-231) desvelan la purificación de varios fragmentos peptídicos de LEDGF. Entre ellos, el péptido de LEDGF, que consta de 1-326 aminoácidos y una etiqueta de His, se purifica utilizando resinas TALON de afinidad metálica en condiciones no desnaturizantes, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Una vez analizado el producto resultante por transferencia Western, se observó que estaba mal purificado, siendo inadecuado para fines terapéuticos.

Los nuevos sistemas de suministro de fármacos han recibido una gran atención ya que podrían mantener o controlar la liberación del fármaco durante un período de tiempo prolongado, así como aumentar la estabilidad y la biodisponibilidad de agentes terapéuticos tales como proteínas, genes y otras moléculas pequeñas. Los implantes biodegradables (PLGA, PCL) y no biodegradables (por ejemplo, Vitrasert y Retisert) proporcionan una plataforma para la liberación sostenida de fármacos durante varios meses o años. Sin embargo, el perfil errático de la liberación de fármacos para implantes biodegradables y la necesidad de cirugía ocular sumamente invasiva, son algunos

inconvenientes. Las micro y nanopartículas proporcionan una liberación sostenida de moléculas encapsuladas durante semanas o meses. Sin embargo, el uso de disolventes orgánicos, tales como diclorometano, durante la preparación, desnatura y reduce la eficacia de las proteínas, lo que conduce a un tratamiento ineficaz. Entre los demás obstáculos se encuentran una mayor eficacia de encapsulación, el control del tamaño de las partículas y la esterilidad durante las preparaciones. También se ha intentado la iontoforesis, las microagujas y el suministro ocular por ultrasonido, sin embargo, los principales avances son con los fármacos de molécula pequeña y todavía están en etapa de investigación y necesitan validaciones para establecer su eficacia y seguridad. Por tanto, el suministro no invasivo o mínimamente invasivo, controlado y sostenido, en el segmento posterior, se está volviendo extremadamente vital con los crecientes avances en las terapias emergentes para las degeneraciones de la retina.

10

Resumen

La presente invención está dirigida a péptidos biológicamente activos de LEDGF que pueden producirse en grandes cantidades, con alto nivel de pureza, o ambas cosas. Por ejemplo, la presente invención está dirigida a péptidos de LEDGF que pueden producirse con una pureza igual o superior a 20 mg por litro de cultivo y con una pureza igual o superior al 90 % según lo cuantificado por SDS-PAGE y SEC-HPLC. En una realización ejemplar, el péptido es un monómero de aproximadamente 40 kDa, que puede existir como un dímero de 80 kDa. En otra realización ejemplar, el péptido tiene principalmente una estructura aleatoria en espiral e incluye un dominio de unión N-terminal relacionado con el estrés, y opcionalmente, un dominio de unión de TAT.

15

20

En otra realización ejemplar, el péptido consiste en 1-326 aminoácidos de LEDGF (LEDGF₁₋₃₂₆). En otra realización ejemplar más, el péptido consiste en la SEQ ID NO: 2. En otra realización ejemplar, el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 %, con la SEQ ID NO: 2. En el presente documento también se desvelan secuencias de ácido nucleico que codifican la SEQ ID NO: 2, o secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias de aminoácidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 %, con la SEQ ID NO: 2. En el presente documento también se desvelan vectores que contienen dichas secuencias de ácido nucleico. Por ejemplo, el vector es un vector pET-28a(+).

25

30

En otro aspecto, la presente invención comprende composiciones que contienen los péptidos LEDGF. En una realización ejemplar, la composición comprende el péptido de LEDGF en combinación con un vehículo, diluyente, excipiente, o combinaciones de los mismos, farmacéutico. En otra realización ejemplar, la composición comprende el péptido LEDGF asociado o unido a partículas metálicas coloidales, tales como zinc, para formar nanoensamblajes. En otra realización ejemplar más, las composiciones comprenden el péptido LEDGF encapsulado o unido a una partícula interna cargada en una partícula externa porosa. El péptido LEDGF usado en las composiciones anteriores es un péptido LEDGF purificado de la invención tal como LEDGF₁₋₃₂₆ purificado.

35

En otro aspecto, la presente invención se dirige a un péptido LEDGF purificado de la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por la agregación de proteínas mediante la administración de las composiciones de péptidos LEDGF anteriores a un paciente que lo necesite. En determinadas realizaciones ejemplares, la enfermedad mediada por la agregación de proteínas es una enfermedad de degeneración de la retina. Las enfermedades ejemplares de degeneración de la retina incluyen, pero sin limitación, degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), retinitis pigmentosa (RP) y retinopatía diabética (RD). En otra realización ejemplar, las enfermedades mediadas por la agregación de proteínas son enfermedades neurodegenerativas que incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Huntington (EH), esclerosis lateral amiotrófica, o una enfermedad causada por priones.

40

45

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** es una inmunotransferencia de LEDGF de longitud completa, purificado, que indica que los intentos de purificar LEDGF de longitud completa dan como resultado un producto inestable y fragmentado.

La **Figura 2** es un diagrama que compara el LEDGF de longitud completa con el LEDGF₁₋₃₂₆.

La **Figura 3** es una imagen de un gel de agarosa que muestra la clonación satisfactoria de una secuencia de ácido nucleico que codifica LEDGF₁₋₃₂₆ en el vector pET-28 a(+). El gen *Ledgf*₁₋₃₂₆ se amplificó mediante PCR (reacción el cadena de la polimerasa) y después se ligó en el vector pET-28 a(+). Carril 1: gen *Ledgf*₁₋₃₂₆ amplificado con PCR, Carril 2: pET-28 a(+) circular sin cortar, Carril 3: pET-28 a(+) linealizado digerido con BamHI, Carril 4: pLEDGF₁₋₃₂₆ circular sin cortar (pET-28 a(+) ligado con *Ledgf*₁₋₃₂₆), Carril 5: pLEDGF₁₋₃₂₆ linealizado digerido con BamHI, Carril 6: pLEDGF₁₋₃₂₆ linealizado digerido con HindIII, Carril 7: pLEDGF₁₋₃₂₆ doblemente digerido con BamHI y HindIII, Carril 8: Amplificación por PCR del gen *Ledgf*₁₋₃₂₆ de pLEDGF₁₋₃₂₆.

55

60

Las **Figuras 4A-C** son un conjunto de gráficos que muestran la expresión y la purificación satisfactoria de LEDGF₁₋₃₂₆: A) SDS-PAGE (acrónimo en inglés de *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, electroforesis en gel de poliácridamida con dodecilsulfato sódico) - Carril 1 Marcador de proteínas (Fermentas, Glen Burnie, MD), Carril 2 lisado celular no inducido, Carril 3 lisado celular inducido con IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactósido), Carril 4 fracción soluble de lisado, Carril 5 LEDGF₁₋₃₂₆ obtenido de la columna de intercambio de cationes de FPLC (acrónimo en inglés de *Fast protein liquid chromatography*, *cromatografía líquida de proteínas a*

65

alta velocidad), Carril 6 LEDGF₁₋₃₂₆ obtenido de la columna de filtración en gel de FPLC; B) cromatograma de intercambio de cationes de FPLC; C) Cromatograma de filtración en gel de FPLC.

Las **Figuras 5A-D** son un conjunto de gráficos que muestran determinadas características físicas de LEDGF₁₋₃₂₆.

A) SEC-HPLC (acrónimo en inglés de *Size Exclusion Chromatography - High-Pressure Liquid Chromatography*, cromatografía de exclusión por tamaño - cromatografía de líquidos de alto rendimiento): LEDGF₁₋₃₂₆ se separó por tamaño en una columna SEC (cromatografía de exclusión por tamaño) de Agilent Bio usando tampón Tris-HCL 25 mM que contenía CaCl₂ 1 mM, pH 7,0. LEDGF₁₋₃₂₆ se eluyó principalmente como pico único a los 11,5 minutos con aproximadamente 5 % de especies de peso molecular más alto. **B)** MALDI-TOF (acrónimo en inglés de *Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation-Time Of Flight*, desorción/ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo): LEDGF₁₋₃₂₆ tiene un peso molecular de 40 kDa, y puede existir como un dímero. **C)** DLS (acrónimo en inglés de *Dynamic Light Scattering*, dispersión dinámica de luz): El tamaño de LEDGF₁₋₃₂₆ se analizó en tampón fosfato 25 mM, pH 7,0 usando Nano ZS. LEDGF₁₋₃₂₆ tenía una población monodispersa de aproximadamente 10 nm de diámetro, sin agregados. **D)** SDS-PAGE (acrónimo en inglés de *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico): LEDGF₁₋₃₂₆ se separó por tamaño en un gel de SDS-PAGE al 4-15 % en condiciones reductoras (con beta-mercaptoetanol y ebullición) y no reductoras (sin beta-mercaptoetanol ni ebullición). El gel no reductor indicó la presencia de dímeros de LEDGF₁₋₃₂₆.

Las **Figuras 6A-B** son un conjunto de gráficos que representan datos adicionales sobre características estructurales pronosticadas de LEDGF₁₋₃₂₆.

A) Dicroísmo circular: Las estructuras secundarias de LEDGF₁₋₃₂₆ 500 µg/ml se analizaron en tampón fosfato 25 mM, pH 7.0 utilizando el espectrómetro Chirascan. No se obtuvieron picos característicos de hélice α o láminas β . Así mismo, la presencia de una fuerte señal negativa a 200 nm indica que LEDGF₁₋₃₂₆ es principalmente una proteína enrollada al azar. **B)** Modelo 3-D (tridimensional) de LEDGF₁₋₃₂₆: La estructura 3-D de LEDGF₁₋₃₂₆ se pronosticó con el servidor de modelado de proteínas I-Tasser basándose en su secuencia de aminoácidos y su homología con proteínas cuyas estructuras están disponibles en el banco de datos de proteínas. Según el modelo 3-D, LEDGF₁₋₃₂₆ es una proteína enrollada al azar.

Las **Figuras 7A-F** proporcionan gráficos adicionales que representan datos adicionales sobre las características estructurales pronosticadas de LEDGF₁₋₃₂₆.

Espectroscopía de fluorescencia-desnaturalización química: **A)** A una longitud de onda de excitación de 280 nm, se registraron espectros de fluorescencia de 300 a 400 nm de 300 µg/ml de LEDGF₁₋₃₂₆ incubados con urea 0 - 6 M en tampón fosfato 25 mM a un pH de 7,0. **B)** Para determinar los parámetros de estabilidad conformacional, la relación de la intensidad de fluorescencia a 340/356 nm se representó gráficamente frente a la concentración de urea. **C)** Se registraron espectros de DC de 220 a 260 nm, de 300 µg/ml de LEDGF₁₋₃₂₆ incubados con urea 0-6 M en tampón fosfato 25 mM a pH 7,0. **D)** Para determinar parámetros de estabilidad conformacional, la señal de DC a 230 nm se representó gráficamente frente a la concentración de urea. **E)** Usando calor, la proteína LEDGF₁₋₃₂₆ se desnaturalizó y se registraron los cambios correspondientes en la señal de DC de 215 a 250 nm. **F)** Para determinar la temperatura de fusión de LEDGF₁₋₃₂₆, la señal de DC a 222 nm se representó gráficamente frente a la temperatura.

Las **Figuras 8A-B** son un conjunto de gráficos que muestran la capacidad de LEDGF₁₋₃₂₆ para rescatar a las células ARPE-19 del estrés mediado por la agregación. Durante 48 horas, células ARPE-19 se trataron con LEDGF₁₋₃₂₆

A) con o **B)** sin estrés de agregación.

Las **Figuras 9A-B** son un conjunto de gráficos que demuestran que LEDGF₁₋₃₂₆ retrasa la pérdida funcional de fotorreceptores en ratas RCS. **A)** El ERG (electrorretinograma) escotópico se registró usando destellos de 0,4 log cd-s/m² y la amplitud de la onda B escotópica se representó gráficamente frente a la edad de las ratas. Para el ERG fotópico, las ratas se adaptaron a la luz usando luz de fondo de 30 cd/m² durante 3 min antes de registrar el ERG. **B)** La amplitud de onda B fotópica se representó gráficamente frente a la edad de las ratas. Se calculó el promedio de tres ERG de ratas individuales, y después, para obtener la media, se calculó el promedio de la amplitud de la onda b en cada grupo. Los datos representan la media \pm DE (desviación estándar) para N = 3. *, p < 0,05 en comparación con el grupo no tratado correspondiente.

La **Figura 10** es un conjunto de gráficos que muestran que los nanoensamblajes de LEDGF₁₋₃₂₆/zinc son estables después de la dilución.

Las **Figuras 11A-C** son un conjunto de gráficos que muestran cambios en la estructura terciaria, secundaria y de tamaño de LEDGF₁₋₃₂₆ con o sin aditivos

La **Figura 12** es una imagen de un gel de SDS-PAGE de LEDGF₁₋₃₂₆ cargado en condiciones reductoras.

Las **Figuras 13A-B** son un conjunto de gráficos que muestran cantidades de proteínas solubles y agregados insolubles de LEDGF₁₋₃₂₆ en presencia y en ausencia de diversos aditivos.

La **Figura 13C** es una imagen de tubos de microcentrífuga que muestra la ausencia de agregados insolubles de LEDGF₁₋₃₂₆ con diversos aditivos.

La **Figura 14** son gráficos que representan la inmunorreactividad de LEDGF₁₋₃₂₆ en presencia y en ausencia de diversos aditivos.

Las **Figuras 15A-C** son un conjunto de gráficos que muestran la caracterización biofísica de la integridad estructural y la estabilidad conformacional de LEDGF₁₋₃₂₆ en presencia de aditivos. A) Intensidad de fluorescencia de LEDGF₁₋₃₂₆ a 342 nm con excitación a 280 nm en función del tiempo en presencia de diversos aditivos. B) Dicroísmo circular (DC) de LEDGF₁₋₃₂₆ a 208 nm en función del tiempo y los aditivos. C) Tamaño hidrodinámico de LEDGF₁₋₃₂₆ en función del tiempo y los aditivos. La Figura 16 es una imagen de un gel de SDS-PAGE que proporciona un análisis de peso molecular de LEDGF₁₋₃₂₆ en función del tiempo.

Las **Figuras 17A-D** son un conjunto de gráficos que muestran la formación de nanoensamblajes de LEDGF₁₋₃₂₆

en presencia de zinc. **A)** Dispersión dinámica de luz. LEDGF₁₋₃₂₆ forma nanoensamblajes en presencia de zinc. **B)** Dicroísmo circular. La estructura secundaria de LEDGF₁₋₃₂₆ se altera en presencia de zinc. **C)** Espectroscopía de fluorescencia. Los espectros de fluorescencia de LEDGF₁₋₃₂₆ se extinguieron en presencia de zinc, lo que indica la exposición de restos hidrófobos en un entorno más polar. **D)** Espectroscopía ultravioleta: La absorbancia uv de LEDGF₁₋₃₂₆ se extinguió en presencia de zinc 0,1 mM y 1 mM pero no con zinc 10 mM.

La **Figura 18** es un conjunto de imágenes de MET (microscopía electrónica de transmisión) de nanoensamblajes de LEDGF₁₋₃₂₆ y zinc.

Las **Figuras 19A-D** son un conjunto de gráficos que demuestran la formación reversible de nanoensamblajes de LEDGF₁₋₃₂₆.

Las **Figuras 20A-D** son un conjunto de gráficos y una imagen de un gel de SDS-PAGE que demuestran el aumento de estabilidad de los nanoensamblajes de LEDGF₁₋₃₂₆ a lo largo del tiempo.

La **Figura 21** es un gráfico que demuestra el aumento de la captación de nanoensamblajes de LEDGF₁₋₃₂₆ por células ARPE-19.

La **Figura 22** es un gráfico que representa los resultados de un ensayo con MTT que demuestra la capacidad de los nanoensamblajes de LEDGF₁₋₃₂₆ para rescatar a las células ARPE-19 de la inanición sérica.

Las **Figuras 23A-D** son un conjunto de gráficos que demuestran la capacidad de los nanoensamblajes de LEDGF₁₋₃₂₆ para reducir la degeneración de la retina examinada usando electroretinografía.

Las **Figuras 24A-H** son un conjunto de gráficos que demuestran la persistencia de los nanoensamblajes de LEDGF₁₋₃₂₆ en la región vítrea durante al menos 14 días, medida a través de la detección de la señal de fluorescencia de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ en ratas SD normales. **A)** Demuestra los resultados de una exploración en blanco antes de la inyección intravítrea en el ojo de ratas SD. **B)** y **C)** demuestran la curva patrón del control y de los ensamblajes de LEDGF₁₋₃₂₆ respectivamente. **D)** y **E)** demuestran la señal de fluorescencia en diversos tejidos, incluida la región vítrea, la coroides-EPR (epitelio pigmentario de la retina) y humor acuoso, obtenida de los escáneres con Flurotrón; **F), G)** y **H)** conversión de la señal fluorescente medida anteriormente a nanoensamblajes de LEDGF₁₋₃₂₆ reales de la región vítrea, la coroides-ERP y humor acuoso, respectivamente.

La **Figura 25** es un gráfico que demuestra la capacidad de los nanoensamblajes para preservar la inmunorreactividad de LEDGF₁₋₃₂₆. Las **Figuras 26A-B** son **A)** un conjunto de imágenes de un ensayo de recuento celular de células ARPE-19 transfectadas con LEDGF₁₋₃₂₆ y **B)** gráficos que demuestran los resultados del ensayo de recuento celular en función del tiempo y de la concentración de LEDGF₁₋₃₂₆. La **Figura 27** es un gráfico que demuestra los resultados de un ensayo que mide la actividad fagocítica e indica un aumento de la actividad fagocítica en células ARPE-19 transfectadas con LEDGF₁₋₃₂₆.

Las **Figuras 28A-D** son un conjunto de imágenes y gráficos que demuestran los resultados de un análisis histológico de ojos de ratas SD inyectados con LEDGF₁₋₃₂₆. **A)** es una representación gráfica de una sección vertical de un ojo en el lugar donde se realiza la inyección intravítrea. **B)** es un conjunto de imágenes de secciones transversales de retinas de ratas SD normales, ratas RCS no tratadas y de ratas RCS tratadas con LEDGF₁₋₃₂₆. **C)** y **D)** son gráficos que representan el espesor medido de las capas nuclear externa e interna del ojo en retinas tratadas con control y con LEDGF₁₋₃₂₆, respectivamente.

La **Figura 29** es un panel de imágenes de inmunofluorescencia de retinas de ratas SD de control y tratadas con LEDGF₁₋₃₂₆.

La **Figura 30** es un gráfico que muestra la liberación acumulativa de His-LEDGF₁₋₃₂₆ de ejemplos de composiciones de PinP

La **Figura 31** son gráficos que muestran los resultados de una fluorofotometría ocular no invasiva después de una inyección intravítrea en ojos de rata con Alexa-His-LEDGF₁₋₃₂₆.

45 Descripción detallada

Definiciones

Como se usa en el presente documento, "retina y retiniano" se refiere tanto a la retina como al segmento posterior general del ojo adyacente a la retina.

Como se usa en el presente documento, "tratar o tratamiento" se refiere a una inversión o eliminación completa de la enfermedad subyacente, a la prevención temporal o sostenida de la progresión de la enfermedad, a la regresión temporal o sostenida de la enfermedad, y a la mejora de uno o más síntomas asociados a la enfermedad.

En el presente documento, los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente. A menos que se indique otra cosa, los términos se refieren a un polímero que tiene al menos dos aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos. Por tanto, los términos incluyen oligopéptidos, fragmentos de proteínas, análogos, derivados, derivados glucosilados, derivados pegilados, proteínas de fusión y similares.

Como se usa en el presente documento, "identidad/similitud de secuencia" se refiere a la identidad o similitud de dos o más secuencias de aminoácidos. La identidad de secuencia puede medirse en términos de porcentaje de identidad, cuanto mayor sea el porcentaje, más idénticas son las secuencias. En la técnica se conocen bien procedimientos de alineamiento y secuencias de comparación. Se describen diversos programas y algoritmos de alineamiento en: Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443; Pearson & Lipman, Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 85:2444, 1988; Higgins & Sharp, Gene, 73:237-44, 1988; Higgins & Sharp, CABIOS 5:151-3, 1989; Corpet et al. Nuc. Acids. Res. 16:10881-10, 1990, presentan un examen detallado de procedimientos de alineamiento de secuencias y de cálculos de homología.

- 5 La herramienta básica de investigación de alineamiento de secuencias de tipo local (BLAST, por las siglas del inglés *Basic Local Alignment Research Tool*) del NCBI (Altschule et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990) está disponible en varias fuentes, incluyendo el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, *National Center for Biological Information*, la Biblioteca Nacional de Medicina, Edificio 38A, Sala 8N805, Bethesda, MD 20894) y en internet, para su uso junto con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, blastn y tblastx. Blastp se usa para
10 comparar secuencias de aminoácidos. Puede encontrarse información adicional en la página web del NCBI.

En general, una vez alineadas, el número de coincidencias se determina contando el número de posiciones donde hay un mismo resto de aminoácido en ambas secuencias. El porcentaje de identidad se determina dividiendo el número de coincidencias, ya sea entre la longitud de la secuencia expuesta en las secuencias identificadas, o entre una
15 longitud articulada (tal como 100 nucleótidos consecutivos o restos de aminoácidos de una secuencia expuesta en una secuencia identificada), y después multiplicado el valor resultante por 100.

Introducción

- 20 El LEDGF de longitud completa tiene la capacidad de rescatar a células epiteliales del pigmento retiniano del estrés inducido por la agregación de rodopsina mutante P23H (Baid et al., PLoS One. 6(9): p. e24616). Sin embargo, el uso de péptidos terapéuticos es un desafío debido a la necesidad de la proteína de conservar una estructura tridimensional específica para permanecer biológicamente activa. Además, a menudo, la producción y la biosíntesis fracasan debido a la ausencia de estabilidad de la proteína durante todo el proceso de biosíntesis y purificación. Así mismo, para utilizar
25 proteínas terapéuticas de manera eficaz, a menudo es necesario conseguir la producción de varios miligramos para caracterizar las propiedades de las proteínas de manera eficaz. Por ejemplo, el LEDGF de longitud completa produce solo 0,9 mg por 500 ml, muy por debajo de las decenas de miligramos que se necesitan para caracterizar adecuadamente la proteína, y da como resultado un producto fragmentado.

- 30 La presente invención proporciona péptidos de LEDGF que conservan la actividad de supervivencia celular de la proteína de longitud completa permitiendo al mismo tiempo la producción y purificación de péptidos de LEDGF en gran cantidad y pureza. Así mismo, los péptidos de LEDGF de la presente invención tienen actividad de agregación anti-proteína. Los péptidos de LEDGF de la presente invención demuestran una capacidad para tratar enfermedades degenerativas y enfermedades asociadas a diversos estreses celulares que incluyen estrés oxidativo y estrés por
35 agregación de proteínas. Por consiguiente, una molécula similar a los péptidos de LEDGF de la presente invención puede representar una proteína terapéutica universal para tratar múltiples enfermedades mediadas por la agregación de proteínas, incluidas otras enfermedades degenerativas y neurodegenerativas de la retina. La presente invención comprende además formulaciones de liberación prolongada de los péptidos de LEDGF útiles en el tratamiento de las enfermedades anteriores.

40

Péptidos de LEDGF

- Los péptidos de LEDGF de la presente invención contienen péptidos N-terminales de LEDGF de longitud completa. En una realización ejemplar, el péptido de LEDGF comprende el dominio de unión relacionado con el estrés N-terminal
45 de LEDGF. Aunque no está limitada por la siguiente teoría, la capacidad de LEDGF para actuar como un factor de transcripción e iniciar la transcripción de otros genes de respuesta al estrés, puede contribuir a la capacidad del péptido de LEDGF para proteger contra enfermedades mediadas por la agregación de proteínas. Como alternativa, los péptidos de LEDGF pueden unirse a proteínas mal plegadas, ya sea directamente o a través de otras proteínas intermedias, y facilitan el plegamiento normal o la ubiquitinación de proteínas mal plegadas para garantizar la
50 degradación proteolítica. En determinadas realizaciones ejemplares, el péptido LEDGF puede comprender además un dominio de unión a TAT.

- En una realización ejemplar, el péptido de LEDGF es LEDGF₁₋₃₂₆ (SEQ ID NO: 2). LEDGF₁₋₃₂₆ se purificó casi hasta la homogeneidad. LEDGF₁₋₃₂₆ tiene principalmente una estructura enrollada al azar, es estable a temperatura
55 ambiente y existe como un monómero de 40 kDa y/o como un dímero de 80 kDa. Como se describe con más detalle en la sección de Ejemplos a continuación, LEDGF₁₋₃₂₆ fue capaz de impedir el estrés por agregación mediado por rodopsina mutante P23H en células ARPE-19. La inyección intravítrea única de LEDGF₁₋₃₂₆ redujo la pérdida funcional de fotorreceptores en el modelo degenerativo de la retina en rata durante más de ocho semanas.

- 60 Los péptidos de LEDGF de la presente invención también incluyen péptidos de LEDGF que tienen una identidad de secuencia de al menos 85 %, de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con LEDGF₁₋₃₂₆. En una realización ejemplar, los péptidos de LEDGF incluyen péptidos que abarcan el dominio de unión N-terminal relacionado con el estrés de LEDGF de longitud completa y una identidad de secuencia de al menos 85 %, de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con LEDGF₁₋₃₂₆. En otra realización ejemplar,
65 los péptidos de LEDGF incluyen péptidos con el dominio de unión N-terminal relacionado con el estrés y un dominio

de unión a TAT y una identidad de secuencia de al menos 85 %, de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con LEDGF₁₋₃₂₆. Así mismo, la presente invención incluye péptidos que abarcan más o menos de los 326 aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en donde los péptidos más grandes o más pequeños no dan como resultado una disminución significativa en la actividad o estabilidad biológica de LEDGF durante la biosíntesis y la purificación.

5 Usando los ensayos descritos más adelante en la sección de Ejemplos, un experto habitual en la técnica puede determinar la idoneidad de un péptido de LEDGF para su uso con la presente invención, evaluando la supuesta similitud del péptido con respecto a las propiedades biofísicas y bioquímicas y la actividad biológica. Como era de esperar, un experto habitual puede reconocer que los péptidos de LEDGF con propiedades biofísicas y bioquímicas y actividad biológica similares a las de LEDGF₁₋₃₂₆ tendrán una utilidad similar.

10

Los péptidos de LEDGF descritos anteriormente pueden prepararse de manera sintética. Como alternativa, los péptidos de LEDGF descritos anteriormente se preparan de manera recombinante. Como hospedadores adecuados para la expresión de los péptidos de LEDGF se incluyen, pero sin limitación, células de *E. coli*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Bacillus*, CHO, BHK, COS y NSO.

15

Formulaciones farmacéuticas estándar

Los péptidos de LEDGF descritos en el presente documento pueden proporcionarse como formulaciones fisiológicamente aceptables usando técnicas conocidas. En Remington's Pharmaceutical Sciences, de E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 19ª Edición (1995), se describen composiciones y formulaciones adecuadas para el suministro farmacéutico de los péptidos de LEDGF desvelados en el presente documento.

20

Las formulaciones de acuerdo con la presente invención pueden administrarse en forma de un comprimido, una cápsula, una pastilla para chupar, una oblea, una solución, una suspensión, una emulsión, un polvo, un aerosol, un supositorio, una pulverización, una pastilla, una pomada, una crema, una pasta, una espuma, un gel, un tampón, un pesario, un gránulo, un bolo, un colutorio, un implante, en un dispositivo, como un colirio o como un parche transdérmico.

25

Las formulaciones incluyen las que son adecuadas para administración oral, rectal, nasal, por inhalación, tópica (incluyendo dérmica, transdérmica, bucal y colirios), vaginal, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intraocular, intratraqueal y epidural), oftálmica (periocular, intraocular, incluyendo supracoroidal, subretinal e intravítrea) o por inhalación. En una realización ejemplar, los péptidos de la presente invención están formulados para el suministro transescleral, supracoroidal, subretinal o intravítrea. El suministro transescleral incluye suministro transescleral subconjuntival, subtenoniano y retrobulbar. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante técnicas farmacéuticas convencionales. Dichas técnicas incluyen la etapa de asociar el principio activo y uno o más vehículos o excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima el principio activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos y a continuación, en caso necesario, dando forma al producto.

30

Las formulaciones de la presente invención, adecuadas para administración oral, pueden presentarse como unidades individuales, tal como cápsulas, obleas o comprimidos, conteniendo cada una de ellas, una cantidad predeterminada del principio activo; como polvos o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite, etc.

45

Un comprimido puede prepararse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos preparados por compresión pueden prepararse comprimiendo, en un aparato adecuado, el principio activo en una forma fluida, tal como polvos o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeando, en un aparato adecuado, una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Opcionalmente, los comprimidos pueden recubrirse o ranurarse y pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del principio activo de los mismos.

50

Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden los principios en una base saborizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga; y colutorios que comprenden el principio que se va a administrar en un vehículo líquido adecuado.

55

Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la piel pueden presentarse como pomadas, cremas, geles, pastas y colirios que comprenden el principio que se va a administrar en un vehículo farmacéutico aceptable.

60

Las formulaciones adecuadas para administración rectal pueden presentarse como un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato.

Las formulaciones adecuadas para administración nasal, en donde el vehículo es un sólido, incluyen un polvo grueso

65

que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 500 micrómetros que se administra de la manera en la que se toma el rapé; es decir, mediante inhalación rápida a través de las fosas nasales desde un envase que contiene el polvo y que se sujeta cerca de la nariz. Las formulaciones adecuadas, en las que para su administración el vehículo es un líquido, tal como, por ejemplo, un aerosol nasal o gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleaginosas del principio activo.

Las formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en aerosol que contienen, además del principio activo, principios, tales como vehículos, que se sabe que son apropiados en la técnica.

10

La formulación adecuada para inhalación puede presentarse como vapores, polvos finos, polvos o formulaciones en aerosol que contienen, además del principio activo, principios, tales como vehículos, que se sabe que son apropiados en la técnica.

15 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones para inyección estéril acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hagan que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor al que están dirigidas; y suspensiones estériles, acuosas y no acuosas, que pueden incluir agentes de suspensión y espesantes; geles; e implantes colocados quirúrgicamente.

20 Formulaciones de nanoensamblaje

En determinadas realizaciones ejemplares, los péptidos de LEDGF de la presente invención, pueden suministrarse como ensamblajes de nanopartículas uniendo, o asociando de otra manera, los péptidos de LEDGF con partículas metálicas coloidales. En la presente invención puede usarse cualquier metal coloidal. Los metales coloidales incluyen cualquier partícula metálica insoluble en agua, compuesto metálico disperso en agua líquida, un hidrosol, o un sol metálico. La partícula metálica coloidal puede seleccionarse de los metales de los grupos IA, IB, IIB y IIIB de la tabla periódica, así como los metales de transición, especialmente los del grupo VIII. Los metales ejemplares incluyen zinc, oro, plata, aluminio, rutenio, hierro, níquel y calcio. Otros metales adecuados incluyen los siguientes en todos sus diversos estados de oxidación; litio, sodio, magnesio, potasio, escandio, titanio, vanadio, cromo, manganeso, cobalto, cobre, galio, estroncio, niobio, molibdeno, paladio, indio, estaño, tungsteno, renio, platino y gadolinio. Los metales proceden, preferentemente, del compuesto metálico apropiado en forma iónica, por ejemplo, Al^{3+} , Ru^{3+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} y Ca^{2+} .

En una realización ejemplar, las nanopartículas se forman añadiendo el metal coloidal directamente a una solución que contiene el péptido de LEDGF. Como se usa en el presente documento, "nanopartículas" se refiere a uno o más péptidos unidos o adsorbidos a la superficie de una sola partícula metálica coloidal, o a un péptido unido o adsorbido a múltiples partículas metálicas coloidales. Como ejemplo, las nanopartículas de LEDGF/Zn se forman añadiendo, de manera controlada y a temperatura ambiente, Zn(II) 10 mM. después de eso, se permite que los nanoensamblajes se formen durante un período de tiempo de 24 horas a 37° C. Un experto habitual en la técnica puede determinar fácilmente las condiciones para la formación de otros nanoensamblajes usando otros metales coloidales.

Formulaciones de partículas dentro de partículas

En otra realización ejemplar, los péptidos de LEDGF están formulados como formulaciones de liberación prolongada de partículas dentro de partículas. Las composiciones de liberación prolongada de la presente invención comprenden una partícula interna contenida dentro de una partícula externa porosa más grande, incluyendo varias arquitecturas tales como una nanopartícula dentro de una micropartícula porosa (NPinPMP, por las siglas del inglés *nanoparticle in porous microparticle*), una nanopartícula pequeña dentro de una nanopartícula grande porosa (SNPinPLNP, por las siglas del inglés *small nanoparticle in porous large nanoparticle*) y una micropartícula pequeña dentro de una micropartícula grande porosa (SMPinPLMP, por las siglas del inglés *small microparticle in porous large microparticle*). La partícula interna es más pequeña y relativamente no expandible en comparación con la partícula más grande. La partícula externa es expandible y forma una estructura significativamente porosa durante el procesamiento que permite la inclusión de la partícula interna dentro de la estructura porosa de la partícula externa.

55 Como se usa en el contexto de la presente invención, se considera que una partícula se expande en presencia de un fluido supercrítico si el área de superficie inicial de la partícula aumenta dentro de un intervalo de aproximadamente 1,25 a aproximadamente 100 veces. En determinadas realizaciones ejemplares, se considera que la partícula se expande si el área de superficie inicial de la partícula se expande dentro de un intervalo de aproximadamente 1,25 a aproximadamente 5 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 veces, de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 veces, de aproximadamente 50 a aproximadamente 75 veces o de aproximadamente 75 a 100 veces. Como alternativa, se considera que una partícula se expande si el tamaño inicial de la partícula aumenta al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 %.

Las partículas internas de la presente invención se preparan usando materiales poliméricos o no poliméricos que no se expanden en presencia de un fluido supercrítico. En determinadas realizaciones ejemplares, el material de

nanopartículas es un material polimérico que no se expandirá en presencia de fluidos supercríticos. En determinadas realizaciones ejemplares, el material polimérico es un material que no se expandirá en presencia de dióxido de carbono supercrítico. Los ejemplos de materiales poliméricos y no poliméricos adecuados que pueden usarse en la presente invención incluyen ácido poliláctico (PLA), poli(ácido glicólico), copolímeros de ácidos láctico y glicólico (PLGA),
 5 derivados de celulosa, quitosano, polietileno (PE), polipropileno, poli(tetrafluoroetileno), poli(tereftalato de etileno), óxido de hierro, óxido de cerio, óxido de zinc, oro, plata, otros metales y cristales biocompatibles, y sílice. Los materiales cristalinos o aquellos con grandes regiones cristalinas, tienen menos probabilidad de expandirse durante el procesamiento del fluido supercrítico. Las partículas internas poliméricas pueden prepararse usando métodos convencionales de emulsión y evaporación de disolvente, u otro método de síntesis similarmente adecuado. Los
 10 péptidos de LEDGF pueden encapsularse en las partículas internas durante la formación o cargarse en la superficie después de la formación de las partículas internas.

Las partículas externas de la presente invención se preparan usando materiales que se expanden en presencia de un fluido supercrítico. En determinadas realizaciones ejemplares, el material de micropartículas es un material polimérico que se expande en presencia de un fluido supercrítico. En determinadas realizaciones ejemplares, el material se
 15 expande en presencia de dióxido de carbono supercrítico. Los ejemplos de materiales poliméricos adecuados que pueden usarse en la presente invención incluyen lactida-coglicólido, poliamidas, policarbonatos, poliaquilenglicoles, óxidos de polialquileño, alcoholes polivinílicos, éteres de polivinilo, ésteres de polivinilo, polivinilpirrolidona, poliglicólidos y copolímeros de los mismos. Además, como materiales poliméricos adecuados también se incluyen
 20 alquicelulosa, hidroxialquil celulosas, éteres de celulosa, éster de celulosa, nitrocelulosas, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropil metil celulosa, hidroxibutil metil celulosa, acetato de celulosa, acetato butirato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, carboxietilcelulosa, celulosa y poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(alcoholes de vinilo), poli(acetato de vinilo) y polivinilpirrolidona. En general, los materiales amorfos o aquellos con grandes regiones amorfas, son
 25 adecuados para la expansión durante el procesamiento del fluido supercrítico. Las partículas externas poliméricas pueden prepararse usando métodos convencionales de emulsión y evaporación de disolvente, u otro método de síntesis similarmente adecuado. En determinadas realizaciones ejemplares, los péptidos de LEDGF pueden encapsularse en las partículas externas durante la formación o cargarse en la superficie después de la formación de las partículas externas.

30 El proceso de generación de diversas arquitecturas de partículas se realiza utilizando la tecnología de flujo de fluidos supercríticos. La carga orgánica sin disolventes resultante es especialmente muy adecuada para fármacos, tales como fármacos basados en péptidos y nucleótidos, que son susceptibles de agregación o degradación. Por ejemplo, el péptido de LEDGF puede cargarse en la superficie de la partícula interna, de la partícula externa o en ambas; en la
 35 matriz de la partícula interna, de la partícula externa o de ambas; presente en los poros de la partícula externa; o una combinación de las mismas. En determinadas realizaciones ejemplares, Los péptidos de LEDGF pueden estar presentes en la superficie de la partícula interna. En otra realización ejemplar, el péptido de LEDGF puede estar presente en la superficie de la partícula interna y externa. En otra realización ejemplar más, los péptidos de LEDGF pueden estar presentes en la matriz de la partícula interna. En otra realización ejemplar, los péptidos de LEDGF
 40 pueden estar presentes en la matriz de la partícula tanto interna como externa. En otra realización ejemplar, también puede haber un agente terapéutico en la estructura porosa de la partícula externa.

Las partículas internas y externas se mezclan entre sí y se exponen a un fluido supercrítico a alta presión. En determinadas realizaciones ejemplares, el fluido supercrítico es dióxido de carbono. Después de la exposición al fluido
 45 supercrítico, las partículas externas se expanden para crear una estructura porosa en la superficie externa. Después, el fluido supercrítico infunde las partículas internas en las externas para formar formulaciones de liberación prolongada de partículas dentro de partículas. En una realización ejemplar, las formulaciones de liberación prolongada de partículas dentro de partículas comprenden la incorporación de nanopartículas internas que tienen un diámetro de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 900 nm en una micropartícula externa que tiene un diámetro de
 50 aproximadamente 1 μm a aproximadamente 100 μm . En otra realización ejemplar, las formulaciones de liberación prolongada de partículas dentro de partículas, comprenden la incorporación de una nanopartícula interna que tiene un diámetro de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 300 nm en una nanopartícula externa que tiene un diámetro de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 999 nm. En otra realización ejemplar más, las formulaciones de liberación prolongada de partículas dentro de partículas, incluyen la incorporación de una micropartícula interna que
 55 tiene un diámetro de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 100 μm en una micropartícula externa que tiene un diámetro de aproximadamente 2 μm a aproximadamente 500 μm . La selección de una partícula interna y de una partícula externa de tamaño apropiado, dependerá del tipo de material que comprenda las partículas, de la capacidad expansiva de la partícula externa en el fluido supercrítico utilizado y del tamaño de las partículas internas que se incorporarán dentro de la partícula externa. Un experto habitual en la técnica puede seleccionar fácilmente todos estos
 60 factores. En general, la relación de tamaño entre la partícula interna y la externa puede variar de aproximadamente 1: 5 a aproximadamente 1: 100. En una realización ejemplar, la relación de tamaño puede ser de 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95 o 1:100

La formación de las NPInPMP (nanopartículas dentro de micropartículas porosas) puede realizarse exponiendo las
 65 nanopartículas y las micropartículas a una presión de aproximadamente 6 895 KPa (1 000 psi) a aproximadamente

- 9 653 KPa (1 400 psi). El tiempo de exposición puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 2 horas. La temperatura puede variar de 30° C a 45° C. La selección de un intervalo apropiado de presión y temperatura está determinada principalmente por el intervalo de temperatura y presiones cercanas al punto supercrítico para un fluido supercrítico dado. Por consiguiente, un experto habitual en la técnica podrá seleccionar el tiempo, la temperatura y la presión apropiados, basándose en el fluido supercrítico utilizado, el tamaño o la cantidad de expansión de la partícula externa deseada, y el grado de porosidad de la partícula externa deseada. Por ejemplo, la exposición durante períodos de tiempo más largos y/o a presiones más altas seguido de extinción por presión dará como resultado una mayor expansión y porosidad que los tiempos y/o presiones de exposición más cortos.
- 10 En una realización ejemplar, las partículas internas y las partículas externas se mezclan a una relación de aproximadamente 1: 3. En una realización ejemplar, la relación utilizada entre las partículas internas y las partículas externas es de aproximadamente 1: 9. Estas relaciones influirán en el alcance de la incorporación de las nanopartículas y en la liberación lenta del fármaco. En general, cuanto mayor sea la cantidad de partículas internas en relación con las externas, mayor será la cantidad de partículas internas incorporadas en las partículas externas, aumentando las tasas de liberación del fármaco y de la dosis. Cuando menor sea la cantidad de partículas internas en relación con las externas, menor será la liberación en estallido.

Enfermedades mediadas por la agregación de proteínas y métodos de tratamiento

- 20 Las formulaciones de LEDGF de la presente invención pueden usarse para tratar enfermedades mediadas por la agregación de proteínas. Las enfermedades mediadas por la agregación de proteínas que pueden tratarse con las composiciones de LEDGF de la presente invención incluyen enfermedades degenerativas de la retina y enfermedades neurodegenerativas. Las enfermedades degenerativas de la retina incluyen degeneración macular relacionada con la edad, retinitis pigmentosa y retinopatía diabética. Las enfermedades neurodegenerativas incluyen enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Huntington (EH), esclerosis lateral amiotrófica y enfermedades priónicas.

En una realización ejemplar, la presente invención comprende el péptido purificado de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad degenerativa de la retina, que comprende administrar a un paciente que tiene una enfermedad degenerativa de la retina, una composición que comprende un péptido de LEDGF de la presente invención. En determinadas realizaciones ejemplares, el péptido de LEDGF es SEQ ID NO: 2. En una realización ejemplar, la composición de LEDGF se suministra por vía transescleral. En otra realización ejemplar, la composición de LEDGF se administra al ojo por vía tópica en forma de colirio. En otra realización ejemplar, la composición de LEDGF se implanta o administra por vía sistémica en una formulación de liberación prolongada. En una realización ejemplar, la formulación de liberación prolongada es una formulación de liberación prolongada de nanoensamblaje, tal como una formulación de nanoensamblaje de LEDGF/zinc. En otra realización ejemplar, la formulación de liberación prolongada es una formulación de partículas dentro de partículas, tal como una formulación de nanopartículas en micropartículas porosas (NPinPMP).

40 En una realización ejemplar, la presente invención comprende el péptido purificado de la invención para su uso en la reducción de la agregación de proteínas en una enfermedad degenerativa de la retina, que comprende administrar a un paciente que tiene una enfermedad degenerativa de la retina, una composición que comprende un péptido de LEDGF de la presente invención. En determinadas realizaciones ejemplares, el péptido de LEDGF es LEDGF₁₋₃₂₆. En una realización ejemplar, la composición de LEDGF se suministra por vía transescleral. En otra realización ejemplar, la composición de LEDGF se administra al ojo por vía tópica en forma de colirio. En otra realización ejemplar, la composición de LEDGF se implanta o administra por vía sistémica en una formulación de liberación prolongada. En una realización ejemplar, la formulación de liberación prolongada es una formulación de liberación prolongada de nanopartículas de la presente invención, tal como una formulación de nanopartículas de LEDGF/zinc. En otra realización ejemplar, la formulación de liberación prolongada es una formulación de partículas dentro de partículas, tal como una formulación de nanopartículas en micropartículas porosas (NPinPMP).

En otra realización ejemplar, la presente invención comprende el péptido purificado de la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, que comprende administrar a un paciente que tiene una enfermedad neurodegenerativa, una composición que comprende un péptido de LEDGF de la presente invención. En determinadas realizaciones ejemplares, el péptido de LEDGF es LEDGF₁₋₃₂₆. En una realización ejemplar, la composición de LEDGF se suministra por vía intraperitoneal. En otra realización ejemplar, la composición de LEDGF se administra por vía oral. En otra realización ejemplar, la composición de LEDGF se administra por vía sistémica en una formulación de liberación prolongada. En una realización ejemplar, la formulación de liberación prolongada es una formulación de liberación prolongada de nanopartículas de la presente invención, tal como una formulación de nanopartículas de LEDGF/zinc. En otra realización ejemplar, la formulación de liberación prolongada es una formulación de partículas dentro de partículas, tal como una formulación de nanopartículas en micropartículas porosas (NPinPMP).

En otra realización ejemplar, la presente invención comprende el péptido purificado de la invención para su uso en la reducción de la agregación de proteínas en una enfermedad neurodegenerativa, que comprende administrar a un

paciente que tiene una enfermedad neurodegenerativa, una composición que comprende un péptido de LEDGF de la presente invención. En determinadas realizaciones ejemplares, el péptido de LEDGF es LEDGF₁₋₃₂₆. En una realización ejemplar, la composición de LEDGF se suministra por vía intraperitoneal. En otra realización ejemplar, la composición de LEDGF se administra por vía oral. En otra realización ejemplar, la composición de LEDGF se administra en una formulación de liberación prolongada. En una realización ejemplar, la formulación de liberación prolongada es una formulación de liberación prolongada de nanopartículas de la presente invención, tal como una formulación de nanopartículas de LEDGF/zinc. En otra realización ejemplar, la formulación de liberación prolongada es una formulación de partículas dentro de partículas, tal como una formulación de nanopartículas en micropartículas porosas (NPinPMP).

10

Las composiciones y los métodos se ilustran además con los siguientes ejemplos no limitativos, que no deben interpretarse en modo alguno como una imposición de limitaciones al alcance de los mismos.

Ejemplos

15

Ejemplo 1

1. Materiales

20 El plásmido pEGFP-LEDGF fue un obsequio del Dr. Toshimichi Shinohara (Centro Médico de la Universidad de Nebraska, Omaha, NE). Los cebadores directo e inverso se adquirieron en Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). La ADN polimerasa I, ADN ligasa de T4 y las enzimas de restricción, se adquirieron en New England Biolab Inc. (Ipswich, MA). El kit QIAquick de extracción en gel, el kit QIAprep spin miniprep y el kit QIAGEN plasmid mini se adquirieron en Qiagen (Valencia, CA). La columna XK 16/20, la columna S-200 de filtración en gel, las perlas SP

25 Sepharose se adquirieron en GE Lifesciences Healthcare (Piscataway, NJ). Las células ARPE-19 se adquirieron en la ATCC (Manassas, VA). El medio de cultivo celular DMEM/F12, el suero bovino fetal, la lipofectamina 2000, el medio LB (*Luria Broth*, caldo Luria) y la agarosa ultrapura, se adquirieron en Invitrogen (Carlsbad, CA). Los restantes materiales, a menos que se especifique, se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

30 **Preparaciones de construcciones de ADN de LEDGF₁₋₃₂₆**

El gen que codifica la proteína LEDGF₁₋₃₂₆ se clonó en un vector pET-28 a (+) (Novagen, Madison, WI). En resumen, el gen *Ledgf*₁₋₃₂₆ se amplificó por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) del plásmido pEGFP-LEDGF usando el cebador directo 5'AGTAGTGGATCCATGACTCGCGATTTCAAAC3' (SEQ ID NO: 3), que consta del lugar de

35 endonucleasa de restricción HindIII, y el cebador inverso 5'AATAATAAGCTTTCACTGCTCAGTTTCCATTTGTTTC3' (SEQ ID NO: 4), que consta del lugar de endonucleasa de restricción BamHI. La amplificación por PCR se realizó usando ADN polimerasa I para la desnaturalización a 94° C durante 5 minutos, seguido de 36 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 30 segundos, hibridación a 50° C durante 45 segundos, y extensión a 72° C durante 2 min, y de una etapa final de extensión a 72° C durante 5 min. El gen *Ledgf*₁₋₃₂₆ amplificado se purificó utilizando el

40 kit QIAquick de extracción en gel siguiendo el protocolo del fabricante. A partir de entonces, el inserto del gen *Ledgf*₁₋₃₂₆ purificado y el vector pET-28a (+) se digirieron en serie en el extremo 5' y 3' usando las enzimas de restricción HindIII y BamHI, respectivamente. Después, se purificaron utilizando un kit QIAprep spin miniprep siguiendo el protocolo del fabricante. Los extremos adhesivos del inserto y el vector se ligaron durante la noche a 4° C usando ADN ligasa de T4. Células competentes DH5α de *Escherichia coli* se transformaron con el producto de ligamiento utilizando

45 un procedimiento de choque térmico siguiendo el protocolo del fabricante. Se recogieron diez colonias y el plásmido se amplificó, se extrajo y se purificó usando el kit QIAGEN plasmid mini. La inserción de *Ledgf*₁₋₃₂₆ en el vector pET-28a (+) se confirmó de tres maneras diferentes, primero mediante exploración con PCR, segundo mediante digestión con enzimas de restricción y finalmente mediante secuenciación de ADN. La pureza y el tamaño del ADN recombinante se analizaron utilizando gel de agarosa al 2 %. Las cuantificaciones de ADN se realizaron usando NanoDrop 1000

50 (Thermo scientific, Wilmington, DE). La colonia que mostraba una señal positiva de PCR y una secuenciación correcta se cultivó adicionalmente y la reserva bacteriana de glicerol se fabricó y conservó -80° C para cualquier uso futuro.

Análisis bioinformático

55 La secuencia de aminoácidos de LEDGF₁₋₃₂₆ se envió al portal de recursos bioinformáticos ExPASy y se calculó el peso molecular, el pl teórico, la composición de aminoácidos, la composición atómica, el coeficiente de extinción y la semivida estimada de LEDGF₁₋₃₂₆.

Expresión y purificación de LEDGF₁₋₃₂₆

60

Para la biosíntesis de proteínas, el plásmido pLEDGF₁₋₃₂₆ se amplificó y se purificó de colonias de DH5α de *Escherichia coli* usando el kit QIAGEN plasmid mini siguiendo el protocolo del fabricante. Después, el plásmido se transformó en cepas BL21 (DE3) de *Escherichia coli* siguiendo el protocolo del fabricante. Después de eso, durante la noche, una colonia individual de la bacteria que contenía el plásmido, se inculó en medio LB (caldo Luria) que contenía 50 µg/ml

65 de kanamicina. a un litro de medio LB, que contenía 50 µg/ml de kanamicina, se le añadió un inóculo al 1 % de cultivo

de crecimiento durante la noche. Se permitió que el cultivo creciera a 37° C hasta que se alcanzó una densidad óptica (D.O.) de 0,6 - 0,8 en el medio de cultivo. La expresión de proteínas se indujo añadiendo IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactósido) a la concentración final de 200 μM. Después de eso, las células se incubaron adicionalmente durante 3 horas a 37° C y se recogieron por centrifugación a 3 000 g durante 15 minutos a 4° C. Las células recogidas se resuspendieron en tampón A (Tris-HCl 25 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM y sacarosa al 5 %). Las células se sometieron a ultrasonido por pulsos (Mesonix, Sonicator 3000, Farmingdale, NY) con una producción del 70 % (36 vatios) durante 5 segundos seguido de enfriamiento durante 15 segundos durante un total de 30 minutos. Las células sometidas a lisis se centrifugaron a 13 000 g durante 20 minutos a 4° C para separar las fracciones solubles e insolubles del lisado. Las fracciones solubles (sobrenadante) e insolubles (sedimento) se analizaron en SDS-PAGE para analizar el contenido proteico y determinar la naturaleza soluble/insoluble de la proteína producida.

FPLC: LEDGF₁₋₃₂₆ se expresó únicamente en la fracción soluble, según se determinó mediante SDS-PAGE. LEDGF₁₋₃₂₆ se purificó en dos etapas utilizando la técnica de cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC, por las siglas del inglés *Fast Protein Liquid Chromatography*), primero en función de la carga (intercambio de cationes) y después en función del tamaño (filtración en gel). En resumen, perlas SP Sepharose de intercambio de cationes se introdujeron en una columna XK 16/20 y se equilibraron usando tampón A a un caudal de 2 ml/min. Después de eso, la fracción soluble se cargó en la columna a un caudal de 1 ml/min. Después, la columna se lavó con un volumen de cinco columnas de tampón A a un caudal de 2 ml/min. La mayoría de las impurezas inespecíficas y unidas laxamente se eluyeron usando un gradiente ácido de cloruro de sodio (0 a 28 % de conductancia). Después de eliminar una proporción significativa de impurezas unidas a la columna, se realizó otra elución de LEDGF₁₋₃₂₆ usando un segundo gradiente de NaCl del 28 al 40 % de conductancia en 40 min. El perfil de elución de la proteína se controló midiendo la absorbancia a 280 nm usando un detector UV incorporado. Se recogieron fracciones de 2,5 ml durante el proceso de elución y se analizaron en SDS-PAGE para determinar la pureza. Las fracciones que contenían una gran cantidad de proteína se agruparon. Las fracciones agrupadas se dializaron usando tampón de diálisis (Tris 25 mM, pH 7,0 y sacarosa al 0,1 %) y después se liofilizaron durante 48 horas. La proteína liofilizada se solubilizó en 2 ml de agua D.I. Para la siguiente etapa de purificación, la columna S-200 de filtración en gel que anteriormente se había rellenado, se equilibró usando el tampón de equilibrio B (Tris-HCl 25 mM, pH 7,0 y NaCl 100 mM) a un caudal de 1 ml/min. La solución concentrada de LEDGF₁₋₃₂₆ de intercambio de cationes se cargó después en la columna S-200. LEDGF₁₋₃₂₆ se eluyó usando el tampón B a un caudal de 1 ml/min. Se obtuvo un pico nítido a aproximadamente 100 minutos, se recogieron fracciones de 1 ml. Las fracciones recogidas se analizaron usando SDS-PAGE. Las fracciones que contenían el LEDGF₁₋₃₂₆ puro se agruparon. Después, el LEDGF₁₋₃₂₆ purificado, se dializó ampliamente en el tampón de diálisis (Tris-HCl 25 mM, pH 7,0 y sacarosa al 0,1 %), durante 48 horas a 4° C con tres intercambios de tampón, para eliminar el exceso de sal y otras impurezas. El LEDGF dializado se congeló y liofilizó durante 48 horas a -80° C. El LEDGF₁₋₃₂₆ liofilizado se dividió en partes alícuotas y se conservó a -80° C para cualquier uso futuro.

Espectroscopía UV: Doce mg del LEDGF₁₋₃₂₆ liofilizado se pesaron con precisión y después se disolvieron en 1 ml de agua D.I. El espectro de absorbancia UV se registró de 200 nm a 400 nm utilizando Spectramax M5 (Molecular Devices, Downingtown, PA). La muestra se diluyó en serie usando agua D.I. hasta que se obtuvo una absorbancia inferior a 1 a 280 nm. Esta absorbancia se utilizó para calcular la cantidad de proteína purificada presente en la muestra en función del coeficiente de extinción molar.

Caracterización física

El peso molecular y la pureza de la proteína LEDGF₁₋₃₂₆ se determinó mediante SDS-PAGE, SEC-HPLC y MALDI-TOF.

SDS-PAGE: Resumiendo, 5 μg de LEDGF₁₋₃₂₆ se hirvieron durante 10 minutos en tampón de muestra de SDS-PAGE (que contiene beta-mercaptoetanol). La muestra proteica se cargó en gel de SDS-PAGE al 4 - 15 % (Bio-Rad, Hercules, CA) y se sometió a electroforesis durante 90 minutos a 30 mA. Después, el gel se tiñó con azul brillante de coomassie y se visualizó con luz blanca usando GelDoc™ XR (Biorad, Hercules, CA). Para la SDS-PAGE no reductora, el LEDGF₁₋₃₂₆ se diluyó en tampón de muestra no reductor (sin beta-mercaptoetanol) y se evitó la ebullición.

SEC-HPLC: La proteína liofilizada se disolvió en agua D.I. hasta una concentración final de 500 μg/ml y se filtró a través de un filtro (PVDF) de 0,22 μm. La proteína se evaluó usando una columna Agilent Bio SEC-3 usando un tampón de Tris 25 mM que contenía CaCl₂ 1 mM, pH 7,0 a 25° C con un caudal de 1 ml/min. La columna se calibró con patrones de peso molecular (Invitrogen). La absorbancia UV se midió a 214 nm.

MALDI-TOF: La homogeneidad e identidad de la proteína se confirmó mediante 4800 Plus MALDI TOF/TOF™ (AB Sciex, Framingham, MA) determinando el peso molecular. La muestra proteica se disolvió en una solución de ácido sinapínico de matriz MALDI estándar, aplicado y secado sobre la placa diana metálica. Los datos se recogieron como corriente iónica total (CIT) de 1 000 disparos láser de intensidad 5 900.

DLS: La homogeneidad y el tamaño de la proteína LEDGF₁₋₃₂₆ se analizó usando zetasizer Nano ZS (Malvern, Westborough, MA). En resumen, la muestra proteica liofilizada se disolvió en agua D.I. hasta obtener una concentración final de proteína de 2,5 mg/ml. El tamaño se midió en términos de número, intensidad y medios de

volumen, utilizando la técnica de dispersión dinámica de luz con toma de datos a un ángulo de retrodispersión de 173°. La medición fue un promedio de 13 escáneres.

Caracterización biofísica

- 5 Para la caracterización biofísica, la proteína se dializó ampliamente en tampón fosfato 25 mM, pH 7,0 para eliminar el Tris-HCl y la sacarosa y se filtró a través de un filtro de jeringa de PVDF de 0,22 µm. Los espectros obtenidos se analizaron usando Origin® 8.5 (OriginLab Corp., Northampton, MA) o SigmaPlot 11.0 (programa informático Systat, Inc, Chicago, IL). Los datos se ajustaron usando las ecuaciones 1 y 2, definidas por Scholtz et.al., como se indica a
- 10 continuación, para determinar el ΔG , el valor m y la $[urea]_{1/2}$ [62].

$$y = \frac{\{(y_F + m_F[urea]) + (y_U + m_U[urea])x e^{-\left(\frac{\Delta G(H_2O) - m[urea]}{RT}\right)}\}}{1 + e^{-\left(\frac{\Delta G(H_2O) - m[urea]}{RT}\right)}}$$

$$\Delta G = \Delta G(H_2O) - m[urea]$$

- 15 donde y_F ° e y_U ° son las intersecciones, en donde Y_F e Y_U son las intersecciones, m_F y m_U son las pendientes de los valores de referencia de la fase anterior y posterior a la transición, y el valor m es la pendiente de la fase de transición. ΔG es el cambio de energía libre a cualquier concentración particular de urea y varía linealmente con la concentración de urea, y se usa para calcular $\Delta G(H_2O)$. $\Delta G(H_2O)$ se define como la estabilidad conformacional de una proteína en
- 20 ausencia de urea a 25° C. R es la constante de gas universal y T es la temperatura de la muestra. $[urea]_{1/2}$ es la concentración de urea a la cual la proteína LEDGF₁₋₃₂₆ está 50 % plegada y 50 % desplegada.

- DC:** Para determinar las estructuras secundarias de LEDGF₁₋₃₂₆ y determinar sus parámetros de estabilidad conformacional, se registró el espectro de DC en el UV lejano de la proteína dializada. En resumen, en una cubeta de
- 25 cuarzo de 1 mm, se colocaron 500 µg/ml de muestra proteica y se registraron los espectros a una velocidad de exploración de 0,5 segundos por punto de tiempo, a un tamaño de paso de 1 nm y una anchura de banda de 4 nm de 200 a 280 nm, utilizando el instrumento Chirascan® CD (Applied Photophysics Ltd, RU). Todos los escáneres se realizaron por triplicado. El espectro de la proteína LEDGF₁₋₃₂₆ nativa obtenido de esta manera, se desconvolucionó utilizando el programa informático de desconvolución de espectros CDNN 2.1 (Dr. Gerald Bohm, Martin-Luther-
- 30 University at Halle, Wittenberg, Alemania, RU) para obtener el porcentaje de diversas estructuras secundarias presentes en la proteína LEDGF₁₋₃₂₆ nativa. Para la estabilidad conformacional de LEDGF₁₋₃₂₆, la desnaturalización química se realizó a diversas concentraciones de urea. En resumen, durante 24 horas, 300 µg/ml de proteína se incubaron con urea 0 a 6 M en tampón fosfato 25 mM, pH 7,0. La señal de DC se registró como se mencionó anteriormente. Los parámetros de estabilidad conformacional de LEDGF₁₋₃₂₆ se determinaron representando
- 35 gráficamente la señal de DC a 230 nm en función de la concentración de urea para obtener la máxima diferencia de señal de DC entre el espectro de la proteína plegada y desplegada a esta longitud de onda. De manera similar, para investigar la estabilidad térmica de LEDGF₁₋₃₂₆, 500 µg/ml de LEDGF₁₋₃₂₆ se sometieron a termodesnaturalización a una temperatura de 25° C a 90° C en modo de rampa suave a una velocidad de rampa de 1° C por minuto. La señal de DC a 222 nm se usó para determinar el punto de fusión (T_m).

- 40 **Espectroscopía de fluorescencia:** Para determinar la perturbación de la estructura terciaria se realizó espectroscopía de fluorescencia en estado estacionario. La muestra proteica (concentración final 300 µg/ml) se incubó con diversas concentraciones de solución de urea (0 a 6 M) en tampón fosfato 25 mM pH 7,0 durante 24 horas. Los espectros de fluorescencia intrínseca del triptófano se registraron de 300 a 400 nm, a una longitud de onda de
- 45 excitación de 280 nm, con un aumento de 1 nm utilizando Spectramax M5 (Molecular Devices, Downingtown, PA). Los parámetros de estabilidad conformacional de LEDGF₁₋₃₂₆ se determinaron representando gráficamente la relación de intensidad de fluorescencia a 340/356 nm en función de la concentración de urea. Todos los valores de intensidad se corrigieron con respecto a los efectos de tampón y de filtro interno.

50 Ensayos de viabilidad celular

- Para determinar la función de la supervivencia celular de LEDGF₁₋₃₂₆ en presencia de estrés mediado por agregación se utilizaron células ARPE-19. En resumen, las células ARPE-19 se conservaron como se describió anteriormente (Baid et al., PLoS One. 6(9): p. e24616). Para el ensayo de viabilidad celular, en una placa de 96 pocillos, se
- 55 sembraron 10 000 células y se incubaron durante 24 horas. Después de 24 horas, se aspiró el medio que contenía suero. Los grupos de ensayo (pP23H-Rho + LEDGF₁₋₃₂₆) se transfectaron transitoriamente con el plásmido pP23H-Rho (1 µg/ml) usando una relación 1: 3 de lipofectamina 2000 en medio asérico siguiendo el protocolo del fabricante. Después de seis horas de transfección, el medio se aspiró y las células se trataron con una cantidad en aumento de LEDGF₁₋₃₂₆ con un intervalo de concentración de 0,001 µg/ml a 50 µg/ml durante 48 horas. Sin células (solo el medio),
- 60 células sin lipofectamina 2000 y células con lipofectamina 2000 también se conservaron como control. Después de 48 horas, el medio se aspiró y se añadieron 200 µl de medio asérico reciente. A cada uno de los pocillos, se añadieron 20 µl de reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol, 5 mg/ml en PBS pH 7,4) y se realizó una

incubación adicional durante 3 horas a 37° C. El medio que contenía MTT se aspiró y el cristal de formazán formado se disolvió en 200 µl de DMSO. La absorbancia del color revelado se midió a 570 nm utilizando Spectramax M5. El porcentaje de viabilidad de los grupos se calculó con referencia al grupo de control que contenía células sin lipofectamina 2000. Todos los grupos se repitieron como n = 4.

5

Mantenimiento de los animales

Se mantuvo una colonia de ratas RCS en la instalación de animales del campus médico Anschutz de la Universidad de Colorado y con la aprobación de la IUCAC. Los experimentos se llevaron a cabo según la declaración ARVO para el uso de los animales en la investigación oftálmica y de la visión.

10

Electrorretinografía

A las 4 semanas de vida, las ratas se adaptaron a la oscuridad durante 30 minutos. Después de eso, el animal se preparó para la ERG con luz roja tenue. En resumen, la rata se anestesió con inyección intraperitoneal de una mezcla de 80 mg/kg de ketamina y 12 mg/kg de xilazina. Después, la pupila se dilató con una gota de tropicamidina al 0,5 % (Akorn, Lake Forest, IL) y se mantuvo húmeda utilizando una gota de hipromelosa al 2,5 % (Akorn, Lake Forest, IL). Después de eso, el animal se colocó sobre una camisa de agua caliente estabilizada a 37° C. Un electrodo de referencia (LKC Technologies Inc., Gaithersburg, MD) se insertó en la cola y la mejilla del animal. Un electrodo DTL plus (LKC Technologies Inc., Gaithersburg, MD) se colocó a través de la córnea de cada ojo. Cada animal se expuso a breves destellos de 0,4 log cd-s/m² con un intervalo de 10 segundos entre cada destello y se registró el ERG escotópico. Después de eso, el animal se adaptó a la luz durante 3 minutos con una luz de fondo de 30 cd/m² (candela por metro cuadrado). El ERG fotópico se registró al mismo destello de intensidad pero con luz de fondo encendida. Se calculó el promedio de al menos tres ERG para obtener un solo ERG de cada rata. Después de eso, en un ojo, se administraron 2 µl de 0,25, 0,5 o 2,5 mg/ml de LEDGF₁₋₃₂₆ por vía intravítrea y en el ojo contralateral se administró vehículo. Los ERG se registraron cada dos semanas durante 8 semanas después de la inyección intravítrea, es decir, hasta las 12 semanas de vida de las ratas.

15

20

25

Análisis estadístico

30

Los datos se representan como la media ± DE (desviación estándar). Se realizó una prueba de la t de Student para muestras independientes o un ANOVA unidireccional seguido de análisis a posteriori de Tukey (SPSS, ver.11.5; SPSS, Chicago, IL) para realizar comparaciones entre los dos grupos experimentales o entre múltiples grupos experimentales, respectivamente. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a un valor de p ≤ 0,05.

35

2. Resultados

LEDGF₁₋₃₂₆ clonado en pET28a(+)

40

A partir de la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen *Ledgf*₁₋₃₂₆, se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 1 000 pares de bases (Figura 3, Carril 1) del plásmido pEGFP-LEDGF. El vector pET-28 a (+) no digerido (Carril 2) mostró una banda positiva a aproximadamente 4,5 kb, que cuando se digirió usando BamHI se linealizó y se desplazó hacia arriba en un marcador de ADN de entre 5 y 6 kb (Carril 3). Cuando el gen *Ledgf*₁₋₃₂₆ se ligó en el vector pET-28a (+) (en lo sucesivo el plásmido así obtenido se denominará pLEDGF₁₋₃₂₆), hubo un cambio de banda ascendente equivalente a ~ 1000 pb, lo que indicaba que la inserción del gen *Ledgf*₁₋₃₂₆ en el vector pET28a (+) se había realizado de manera satisfactoria (Carril 4). Para confirmar el ligamiento, el plásmido pLEDGF₁₋₃₂₆ se digirió individualmente con BamHI (Carril 5) o HindIII (Carril 6). El plásmido pLEDGF₁₋₃₂₆ se linealizó mediante las dos reacciones de digestión con las enzimas de restricción y la banda de ADN se observó a aproximadamente 6,4 kb, que era 1 000 pb más que el vector pET28a (+). La digestión doble de pLEDGF₁₋₃₂₆ usando BamHI y HindIII dio como resultado dos fragmentos, un fragmento más grande de -5,4 kb (banda superior, Carril 8) y un fragmento más pequeño de ~ 1 000 pb (banda inferior, Carril 7). La amplificación por PCR del gen *Ledgf*₁₋₃₂₆ a partir de pLEDGF₁₋₃₂₆ dio como resultado una banda de ADN positiva de aproximadamente 1 000 bases (Carril 8), lo que indicaba que la inserción de LEDGF₁₋₃₂₆ en el vector pET-28 a (+) se había realizado de manera satisfactoria.

50

Análisis bioinformático de LEDGF₁₋₃₂₆

El análisis bioinformático de la secuencia de LEDGF₁₋₃₂₆ usando SIB ExpASy (Gasteiger et al., Nucleic Acids Res, 2003. 31(13): págs. 3784-8) indicó su peso molecular teórico de 36,9 kDa. El punto isoeléctrico (pI) calculado de LEDGF₁₋₃₂₆ fue de 9,23, con 73 restos de aminoácidos con carga positiva (arginina y lisina) y 63 con carga negativa (ácido aspártico y ácido glutámico). El coeficiente teórico de extinción molar fue de 15 470 M⁻¹ cm⁻¹ a 280 nm en agua. Basándose en su aminoácido N-terminal metionina, se pronosticó que su semivida en células de mamífero era de 30 horas.

60

LEDGF₁₋₃₂₆ purificado en grandes cantidades

65

Cuando la proteína LEDGF₁₋₃₂₆ se expresó en condiciones específicas en células BL21(D3B), apareció una nueva banda positiva fuerte, a aproximadamente 40 kDa, lo que indicaba la expresión de la proteína LEDGF₁₋₃₂₆ (Figura 4A, Carril 3). Esta banda apareció en la fracción sobrenadante después de la lisis de células bacterianas, lo que indicaba que LEDGF₁₋₃₂₆ se expresó como proteína soluble en cultivo bacteriano (Carril 4). LEDGF₁₋₃₂₆ se purificó del lisado celular bruto usando un sistema de cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC). En la primera etapa de purificación, se usó una columna de intercambio de cationes (Figura 4B). La proteína no unida y otras impurezas celulares, incluidos lípidos, se eluyeron durante la fase de lavado de la columna (100-280 ml). Después de eso, otras proteínas celulares que estaban unidas laxamente a la columna se eluyeron cuando la conductancia de la fase móvil se aumentó del 0 al 28 % usando un gradiente ácido de cloruro de sodio (NaCl) (280-400 ml). Cuando el gradiente de NaCl se aumentó aún más lentamente durante 40 minutos hasta alcanzar una conductancia del 40 %, LEDGF₁₋₃₂₆ se eluyó (400-450 ml). Cuando la fracción recogida se analizó usando SDS-PAGE, se observó una fuerte banda de LEDGF₁₋₃₂₆ a ~ 40 kDa, junto con otras bandas de menor peso molecular (Figura 4A, Carril 5). En una purificación adicional utilizando la columna de filtración en gel, LEDGF₁₋₃₂₆ se eluyó como el primer pico (fracciones recogidas), seguido de picos de otras proteínas de pesos moleculares más pequeños (Figura 4C). Las fracciones agrupadas de las columnas de filtración en gel indicaron una banda positiva fuerte de ~ 40 kDa en la SDS-PAGE junto con bandas de peso molecular muy débiles y pequeñas lo que indica la purificación casi completa de LEDGF₁₋₃₂₆ (Figura 4A, Carril 6). La estimación de proteínas indicó que se obtuvieron aproximadamente 20 mg de proteína por litro de cultivo en el matraz de agitación.

LEDGF₁₋₃₂₆ se purifica hasta casi la homogeneidad

La pureza de la proteína LEDGF₁₋₃₂₆ se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC) (Figura 5A). Se observaron dos picos, el primer pico tuvo un tiempo de retención de 10,5 min y el segundo pico tuvo un tiempo de retención de aproximadamente 11,5 min. Cuando se integró el área bajo la curva, el primer pico fue solo del 5 % y el segundo pico fue del 95 %, lo que indicaba que la proteína LEDGF₁₋₃₂₆ tenía una pureza de aproximadamente un 95 %. El peso molecular de LEDGF₁₋₃₂₆ se confirmó mediante desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF). El pico principal obtenido en el espectro MALDI-TOF estaba a una relación de 40314,32 y 80663,19 m/z (masa con respecto a carga) (Figura 5B). MALDI-TOF indicó que LEDGF₁₋₃₂₆ tenía un peso molecular de 40 kDa, que era equivalente al peso molecular teórico. También se observó un segundo pico a 80663 m/z, lo que indicaba que LEDGF₁₋₃₂₆ podía existir como dímero. Para investigar la existencia de los dímeros, se ejecutó SDS-PAGE de LEDGF₁₋₃₂₆ en condiciones reductoras y no reductoras (Figura 5D). En condiciones no reductoras, hubo un cambio ascendente de la banda de LEDGF₁₋₃₂₆ a un tamaño de 95-105 kDa, indicando que LEDGF₁₋₃₂₆ podía existir en forma dimérica. En condiciones reductoras/desnaturalizantes, los dímeros se disociaron en monómeros.

Para investigar más a fondo si LEDGF₁₋₃₂₆ se autoasociaba para formar cualquier oligómero de mayor peso molecular, se realizó dispersión dinámica de luz (DLS) (Figura 5C). Se obtuvo una población homóloga que tenía un solo pico (distribución del 100 %) para la intensidad o el número o la distribución del tamaño del volumen de las partículas. Los tres picos estaban en la estrecha distribución de tamaños, lo que indica un intervalo de tamaño muy cercano. No hubo otros picos de mayor tamaño que indicaran la ausencia de cualquier tipo de oligómeros. A partir de la DLS, se obtuvo un diámetro promedio z de 11,32 nm y un índice de polidispersidad de 0,15.

LEDGF₁₋₃₂₆ se enrolla al azar

Para investigar la estructura secundaria de la proteína LEDGF₁₋₃₂₆, se analizó el espectro de dicroísmo circular (DC) en el UV lejano de la proteína LEDGF₁₋₃₂₆ nativa (Figura 6A). La señal de DC se mantuvo negativa de 280 a 200 nm. Después de 220 nm, hubo una fuerte disminución en la señal de DC. No había bandas negativas características a 222 nm y 208 nm, tampoco había ninguna banda positiva característica cerca de 200 nm que indicara que LEDGF₁₋₃₂₆ no poseía predominantemente hélice α o láminas β . De hecho, una elipticidad muy baja por encima de 210 nm y una banda negativa por debajo de 200 nm indicaron que la proteína LEDGF₁₋₃₂₆ podía estar compuesta principalmente por una estructura enrollada al azar.

Para analizar minuciosamente aún más la estructura secundaria de LEDGF₁₋₃₂₆, el espectro de DC se desconvolucionó utilizando el programa informático CDNN 2.1. Suponiendo que el espectro obtenido es la combinación lineal del espectro individual de los elementos componentes de la estructura secundaria y el ruido debido a los cromóforos aromáticos y grupos protésicos, se pronosticó que la proteína LEDGF₁₋₃₂₆ estaba enrollada al azar en un 45,1 %. El giro β fue de aproximadamente 21,2 %, había un 15 % de láminas β paralelas y un 16 % de láminas β antiparalelas. La contribución de la hélice α fue solo de aproximadamente 16 %.

La estructura tridimensional de la proteína LEDGF₁₋₃₂₆ nativa se pronosticó utilizando el servidor de modelado de proteínas I-Tasser (*Iterative Threading Assembly Refinement*) (Figura 6B). El modelo pronosticado de LEDGF₁₋₃₂₆ tenía una puntuación de confianza (puntuación C) de -3,18, un modelado de molde (puntuación TM) de $0,36 \pm 0,12$, y la desviación de la raíz cuadrática media (RMSD, siglas del inglés *root mean square deviation*) fue igual a $14,1 \pm 8 \text{ \AA}$, lo que indicaba que el modelo pronosticado era fiable. Según el modelo pronosticado, LEDGF₁₋₃₂₆ era

predominantemente una proteína enrollada al azar.

LEDGF₁₋₃₂₆ es conformacionalmente estable

5 Para comprender la estabilidad conformacional de LEDGF₁₋₃₂₆ en agua, la perturbación en la estructura terciaria debido a la desnaturalización química se determinó midiendo la fluorescencia intrínseca de las moléculas de triptófano presentes en LEDGF₁₋₃₂₆ (Figuras 7A y 7B). El espectro de emisión de la proteína LEDGF₁₋₃₂₆ nativa, en ausencia de urea, tenía una $\lambda_{\text{máx}}$ a 340 nm y una $\Delta\lambda_{1/2}$ (anchura media de $\Delta\lambda$) de 56 nm (Figura 7A). A medida que la concentración de urea aumentaba de 0 a 5 M, se observaba extinción de la señal de fluorescencia, así como el desplazamiento hacia el rojo (desplazamiento máximo de fluorescencia hacia la derecha). La señal disminuyó lentamente hasta alcanzar una concentración de urea de 0,9 M. Después de eso, hubo una clara disminución en la señal de fluorescencia hasta que se alcanzó una concentración de urea de 2,3 M. Más allá de esta concentración, la disminución de la señal de fluorescencia fue mínima. La $\lambda_{\text{máx}}$ de LEDGF₁₋₃₂₆ se desplazó a 356 nm y la $\Delta\lambda_{1/2}$ fue de 71 nm a una concentración de urea de 5 M. Cuando la relación de la señal de fluorescencia de LEDGF₁₋₃₂₆ a de 340 a 356 nm se representó gráficamente en función de la concentración de urea, se obtuvo una curva sigmoidal (Figura 7B). Hubo una disminución lenta de la señal de fluorescencia de 0 a 1 M de urea (fase anterior a la transición) y después una fuerte disminución de 1 a 3 M de urea (fase de transición) seguido de una fase de disminución lenta de 3 a 5 M (fase posterior a la transición). Usando las ecuaciones 1 y 2 (descritas en los métodos), se calculó que el $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ de LEDGF₁₋₃₂₆ era de $3,24 \pm 0,48 \text{ kcal mol}^{-1}$, que el valor m era de $1,70 \pm 0,22 \text{ kcal mol}^{-1}\text{M}^{-1}$ y que la $[\text{urea}]_{1/2}$ era de $1,81 \pm 0,02 \text{ M}$, lo que indicaba que LEDGF₁₋₃₂₆ era una proteína estable.

Para investigar la perturbación en las estructuras secundarias de LEDGF₁₋₃₂₆ en presencia de urea, se realizó espectroscopía de DC en el UV lejano (Figuras 7C y 7D). La señal de DC de LEDGF₁₋₃₂₆ se trazó frente a la longitud de onda a cada concentración de urea (Figura 7C). La señal de DC se volvió continuamente más negativa a medida que aumentaba la concentración de urea. Cuando se representó gráficamente la señal de DC a 230 nm en función de la concentración de urea (Figura 7D), se obtuvo una curva sigmoidal. Ajustando los datos en las ecuaciones 1 y 2, se indicó que el $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ de LEDGF₁₋₃₂₆ era de $3,28 \pm 0,40 \text{ kcal mol}^{-1}$, el valor m de $1,90 \pm 0,19 \text{ kcal mol}^{-1}\text{M}^{-1}$ y la $[\text{urea}]_{1/2}$ era de $1,61 \pm 0,02 \text{ M}$.

LEDGF₁₋₃₂₆ es térmicamente estable

La estabilidad térmica de LEDGF₁₋₃₂₆ se determinó usando espectroscopía de DC en el UV lejano (Figuras 7E y 7F). La señal de DC en presencia de calor como desnaturalizante se midió desde 215 - 250 nm (Figura 7E). A medida que la temperatura de la solución de LEDGF₁₋₃₂₆ aumentaba, se observaba que la caída negativa obtenida a aproximadamente 235 nm aumentaba. La señal de CD siguió el mismo patrón que el de la desnaturalización química, una fase anterior a la transición entre $\sim 30 - 35^\circ \text{ C}$, seguido de una fase de transición entre $\sim 35 - 55^\circ \text{ C}$, seguido de una fase posterior a la transición de $\sim 55 - 70^\circ \text{ C}$ (Figura 7F). Cuando estos datos se ajustaron usando un análisis de ajuste global, la T_m (la temperatura de fusión (*melting*)) obtenida de LEDGF₁₋₃₂₆ fue de $44,82 \pm 0,17^\circ \text{ C}$ lo que indicaba que LEDGF₁₋₃₂₆ será posiblemente estable a 25° C (temperatura ambiente).

40

LEDGF₁₋₃₂₆ rescata a las células ARPE-19 del estrés mediado por la agregación

La actividad de LEDGF₁₋₃₂₆ para rescatar a las células ARPE-19 del estrés mediado por la agregación de proteínas se midió mediante un ensayo de viabilidad celular (Figura 8). Inicialmente, se investigó la capacidad de LEDGF₁₋₃₂₆ para aumentar la viabilidad de las células ARPE-19 en ausencia de estrés (Figura 8A). Después de 48 horas de tratamiento, no hubo diferencias significativas en la viabilidad celular en las células no tratadas y en las tratadas con LEDGF₁₋₃₂₆ a una dosis de 0,001 a 50 $\mu\text{g/l}$. A la dosis más alta de LEDGF₁₋₃₂₆ (50 $\mu\text{g/ml}$), la viabilidad celular fue de $108,14 \pm 5,63 \%$ (la barra más a la derecha) en comparación con $100 \pm 13,19 \%$ para las células no tratadas (barra más a la izquierda), lo cual no fue significativo. En células ARP-19 transfectadas con pP23H-Rho, LEDGF₁₋₃₂₆ se comportó de manera diferente (Figura 8B). Las células que expresan rodopsina mutante P23H mostraron una disminución de la viabilidad celular a $48,25 \pm 5,62 \%$ (Barra 2). Esta pérdida de viabilidad celular podría atribuirse al efecto tóxico de la expresión y la acumulación de la proteína rodopsina mutante P23H propensa a la agregación en las células. Cuando las células que expresan rodopsina mutante P23H (barra 3 - 9) se trataron con una cantidad en aumento de LEDGF₁₋₃₂₆, se observó un aumento de la viabilidad celular. LEDGF₁₋₃₂₆ aumentó la viabilidad celular de las células ARPE-19 de $48,25 \pm 5,62$ a $77,02 \pm 10$, a una concentración tan baja como 0,001 $\mu\text{g/ml}$. 20 %. Más allá de este punto, la viabilidad celular permaneció significativamente más alta que la del grupo no tratado transfectado con pP23H-Rho (barra 2).

LEDGF₁₋₃₂₆ retrasa la pérdida funcional de fotorreceptores

60 Se investigó la eficacia de LEDGF₁₋₃₂₆ para retrasar la pérdida de función visual de los fotorreceptores en ratas RCS monitorizando los electroretinogramas (ERG). En el ERG adaptado a la oscuridad (escotópico), la amplitud de la onda b de las ratas no tratadas y tratadas varió entre $180,17 \pm 27,42$ y $216,60 \pm 35,30 \mu\text{V}$ a las 4 semanas de vida (ERG base), antes de que se administrara la inyección intravítrea (Figura 9A). Dos semanas después de la inyección intravítrea, en todos los grupos hubo una clara disminución de la amplitud de la onda b, el valor varió de $65,80 \pm 15,44$ a $91,13 \pm 13,94 \mu\text{V}$. No hubo diferencias significativas en el grupo no tratado y en los tratados con LEDGF₁₋₃₂₆. Sin

65

embargo, más allá de dos semanas, hubo una disminución continua en la amplitud de la onda b en todos los grupos, con un descenso más lento en los grupos tratados con LEDGF₁₋₃₂₆. Ocho semanas después de la inyección intravítrea, la amplitud de la onda b del grupo no tratado y de los tratados con 0,5, 1,0 y 5 µg de LEDGF₁₋₃₂₆, fue de 9,40 ± 4,57, 32,43 ± 10,34, 37,93 ± 0,60 y 57,63 ± 8,81 µV, respectivamente. La amplitud de la onda b de los grupos tratados con LEDGF₁₋₃₂₆ fue significativamente mayor (p<0,05) que la del grupo no tratado. Se observó un retraso dependiente de la dosis en la disminución de la amplitud de la onda b en los grupos tratados con LEDGF₁₋₃₂₆. Con dosis en aumento de LEDGF₁₋₃₂₆, se redujo la pérdida de amplitud de la onda b.

En el ERG adaptado a la luz (fotópico), la amplitud de la onda b base, antes de la inyección intravítrea, en la semana 4, estaba en el intervalo de 69,83 ± 16,49 a 80,97 ± 8,60 µV, sin diferencias significativas entre el grupo no tratado y en los tratados con LEDGF₁₋₃₂₆ (Figura 9B). La amplitud de la onda b del grupo no tratado disminuyó de 80,97 ± 8,60 a 10,90 ± 5,64 µV, mientras que en los grupos tratados con 0,5, 1,0 y 5,0 µg de LEDGF₁₋₃₂₆ la disminución fue de 79,63 ± 20,30 a 41,33 ± 9,20, 69,83 ± 16,49 a 28,00 ± 7,23 y 68,75 ± 15,93 a 45,78 ± 15,18 µV, respectivamente. Después de ocho semanas de una sola inyección intravítrea de LEDGF₁₋₃₂₆ la amplitud de la onda b de los grupos tratados con LEDGF₁₋₃₂₆ fue significativamente mayor (p<0,05) que la del grupo no tratado, similar a la del ERG escotópico.

Ejemplo 2

1. Materiales y métodos

Materiales- El isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG), ácido cítrico, hidrogenofosfato sódico dibásico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), Tween 20, sacarosa, azida sódica, se adquirieron en Sigma-Aldrich (). Para la purificación de proteínas se utilizó FLPC (cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad) de AKTA. Todos los cromatogramas se analizaron utilizando el programa informático UNICORN. Todos los productos químicos, a menos que se especifique, se adquirieron en Sigma Aldrich y eran de calidad reactiva o superior.

El gen *LEDGF₁₋₃₂₆* sin etiqueta de His se amplificó del plásmido pLEDGF₁₋₃₂₆ utilizando los cebadores 5'AGCAAGCCATGGGCATGACTCGCGATTTCAAACCTGGA3' (SEQ ID NO: 5) y 5'AGCAAGAAGCTTCTACTGCTCAGTTTCCATTTGTTCTC3' (SEQ ID NO: 6) que contenían lugares de NcoI y HindIII, respectivamente. Después de eso, el gen *LEDGF₁₋₃₂₆* se ligó en pET-28a (+) después de la digestión con las enzimas NcoI y HindIII. El producto ligado se transformó en células competentes DH5α de *Escherichia coli* siguiendo el manual del usuario. La inserción del gen se confirmó mediante PCR, digestión con enzimas de restricción y métodos de secuenciación.

Biosíntesis y purificación de LEDGF₁₋₃₂₆: LEDGF₁₋₃₂₆ (sin etiqueta de His) se biosintetizó y purificó como se ha descrito anteriormente (Ref-JBC). En resumen, LEDGF₁₋₃₂₆ se expresó en *Escherichia coli* BL21 (DE3) utilizando IPTG 1 mM. LEDGF₁₋₃₂₆ se purificó de lisados celulares usando cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC) en dos etapas, primero en función de la carga (intercambio de cationes) y después en función del tamaño (filtración en gel). El LEDGF₁₋₃₂₆ purificado se dializó ampliamente en tampón de citrato-fosfato, pH 7,0, se concentró y se conservó a -80° C hasta su uso posterior.

Preparación de la formulación: La formulación de LEDGF₁₋₃₂₆ (1 o 0,5 mg/ml) en tampón de citrato-fosfato se realizó a un pH que variaba entre 6 y 7,5. Se añadieron aditivos Tween 20, EDTA y sacarosa a la concentración final de 0,1 % (p/v), 1 mM, 10 % (p/v), respectivamente. La formulación que contenía azida sódica al 0,02 % se analizó para detectar cualquier degradación que pudiera ocurrir debido al crecimiento microbiano. Una vez preparadas, todas las formulaciones se conservaron a 25° C en una incubadora con temperatura controlada y se tomaron las medidas adecuadas para impedir cualquier evaporación.

Espectroscopía de Fluorescencia: Para determinar los cambios en la estructura terciaria, se realizó espectroscopía de fluorescencia en estado estacionario. Los espectros de fluorescencia intrínseca del triptófano (Trp) de las formulaciones se registraron de 300 a 400 nm, a 280 nm de excitación, con un aumento de 1 nm utilizando Spectramax M5 (Molecular Devices, Downingtown, PA). Para medir los cambios en la fluorescencia, se representó gráficamente la intensidad de fluorescencia a 342 nm para cada pH y cada punto de tiempo. Los efectos del tampón y del filtro interno se corrigieron para todos los valores de fluorescencia.

Dicroísmo circular (DC): Los cambios estructurales secundarios de LEDGF₁₋₃₂₆ se determinaron mediante espectros de DC en el UV lejano. En resumen, la formulación se colocó en una cubeta de cuarzo de 1 mm y los espectros se registraron a una velocidad de exploración de 0,5 segundos por punto de tiempo, a un tamaño de paso de 1 nm y una anchura de banda de 4 nm de 200 a 280 nm, utilizando el instrumento Chirascan® CD (Applied Photophysics Ltd, RU).

Dispersión dinámica de luz (DLS, Dynamic light scattering): El tamaño de la proteína LEDGF₁₋₃₂₆ se monitorizó utilizando Nano ZS (Malvern, Westborough, MA). Resumiendo, en una cubeta de vidrio de bajo volumen, se colocaron 100 µl de formulación. Usando dispersión dinámica de luz, se tomaron datos de dispersión de partículas de LEDGF₁₋₃₂₆ a un ángulo de retrodispersión de 173°. Se registró un promedio de 13 escáneres para cada medición.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE): Muestras de formulación de LEDGF₁₋₃₂₆ (10 µg) se hirieron durante 10 min a 75° C junto con 10 µl de tampón de carga 2x. Las muestras se cargaron en geles miniPROTEAN TGX al 4-15 % y las proteínas se separaron por tamaño. Las proteínas se visualizaron usando tinción con azul de Coomassie siguiendo el protocolo del usuario.

5 **Cálculo de proteínas:** Para el cálculo de proteínas, la formulación de LEDGF₁₋₃₂₆ se centrifugó a 10 000 g durante 5 min y se recogió el sobrenadante. El cálculo de proteínas del sobrenadante se realizó utilizando el kit de ensayo BCA siguiendo el manual del usuario. Para el cálculo de agregados insolubles, la proteína soluble medida en cada punto de tiempo se sustrajo de los niveles de proteína del día 0 de la formulación correspondiente.

10 **ELISA:** Se desarrolló un método ELISA indirecto para determinar el porcentaje de LEDGF₁₋₃₂₆ inmunorreactivo en las formulaciones. En resumen, en una placa de 96 pocillos, se aplicaron 100 µl de muestras de LEDGF₁₋₃₂₆ estándar (recién purificadas) o de formulación durante la noche a 4° C por triplicado. Después de cada etapa, los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado (Tween 20 al 0,1 % p/v en PBS, pH 7,0). Los lugares de unión inespecíficos se bloquearon durante 4 horas con solución de bloqueo (albúmina de suero bovino al 0,5 % y Tween 20 al 0,1 % en PBS, pH 7,0). El anticuerpo anti-LEDGF de ratón (BD Biosciences, San Diego, CA) detectó el LEDGF₁₋₃₂₆ el cual se detectó de manera cruzada con anticuerpo un secundario anti-ratón conjugado con HRP (fuente). Después de lavar toda la placa, finalmente se añadió 3,3' 5,5'-tetrametilbencidina (TMB). El LEDGF₁₋₃₂₆ inmunorreactivo se cuantificó por absorbancia colorimétrica a 650 nm tras el revelado de color azul.

20 **Análisis estadístico:** Todos los datos se representan como la media ± DE. Para la comparación entre múltiples grupos, se han combinado los datos de todos los pH, calculado el promedio y comparado con las correspondientes formulaciones que contienen aditivos. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA unidireccional seguido de análisis a posteriori de Tukey (SPSS, ver.11.5; SPSS, Chicago, IL). Un valor de $p \leq 0,05$ se consideró que era estadísticamente significativo.

2. Resultados

Clonación y purificación de LEDGF₁₋₃₂₆ sin etiqueta de His

30 La amplificación por PCR condujo a una banda de 1 000 pb de LEDGF₁₋₃₂₆. La digestión con enzimas de restricción, el ligamiento y posterior amplificación por PCR del gen LEDGF₁₋₃₂₆ insertado en el plásmido indicó una banda positiva de LEDGF₁₋₃₂₆. La purificación de la proteína LEDGF₁₋₃₂₆ indicó una banda de monómero de 40 kDa junto con bandas de peso molecular muy débiles y pequeñas lo que indica que LEDGF₁₋₃₂₆ podría haber sufrido algún tipo de degradación durante el proceso de purificación.

Los aditivos aumentan la estabilidad de LEDGF₁₋₃₂₆

40 El efecto de los aditivos Tween 20, EDTA y sacarosa, sobre la estabilidad de LEDGF₁₋₃₂₆, se monitorizó en tampón de citrato-fosfato a un pH que variaba entre 6,0 y 7,5. La perturbación de la estructura terciaria en LEDGF₁₋₃₂₆ se monitorizó midiendo el comportamiento de la fluorescencia del triptófano (Trp) en LEDGF₁₋₃₂₆ (Figura 11A). La formulación de LEDGF₁₋₃₂₆ (0,5 mg/ml) no indicó diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia a 342 nm con respecto al pH del tampón (Figura 11 A(ii)). El día 0, formulaciones de LEDGF₁₋₃₂₆ en tampón puro, indicaban una intensidad de fluorescencia inicial de $5\,163 \pm 302$ U.R.F. (Unidades Relativas de Fluorescencia) a 342 nm en un intervalo de pH de 6,0 a 7,5. El día 1 hubo un aumento en la intensidad de fluorescencia a $6\,198 \pm 102$ que disminuyó significativamente a $3\,518 \pm 305$ U.R.F. el día 3, lo que indicaba una pérdida de intensidad de señal de ~ 43 % en comparación con el día 1. El día 14 hubo una pérdida en la intensidad de la señal del 87 %. Los espectros de fluorescencia indicaban un desplazamiento al rojo en la máxima intensidad de fluorescencia el día 3, el día 7 y más allá, los espectros eran casi planos.

50 Los aditivos no cambiaron la intensidad de fluorescencia inicial de LEDGF₁₋₃₂₆ y no hubo diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia de las formulaciones con o sin aditivos el día 0 (Figura 11 A(ii)). No hubo pérdida significativa en la señal de fluorescencia, así como tampoco desplazamiento en la máxima fluorescencia hasta el día 60 en todo el intervalo de pH.

55 La perturbación de la estructura secundaria en LEDGF₁₋₃₂₆ se monitorizó mediante DC. La figura 11B indica la elipticidad de LEDGF₁₋₃₂₆ a 208 nm para diversas formulaciones a un pH de 6,0 - 7,5 en función del tiempo. El DC indicó que la estructura secundaria de LEDGF₁₋₃₂₆ estaba principalmente enrollada al azar. LEDGF₁₋₃₂₆ indicó una elipticidad de $-17,5 \pm 0,1$ mDeg el día 0 que se redujo significativamente a $-13,9 \pm 0,8$ mDeg el día 3 (Figura 11B(i)).
60 Hubo una disminución adicional en la señal de DC y desde el día 7 en adelante la elipticidad fue de $-3,4 \pm 2,3$ mDeg. No hubo diferencias significativas en la señal de DC en formulaciones con o sin aditivos el día 0 (Figura 11B(ii)). La señal de DC el día 0 y el día 60 fue de $-17,9 \pm 0,3$ y $-19,1 \pm 1,4$ mDeg, respectivamente, para todas las formulaciones que contenían aditivos lo que indicaba que no hubo cambios significativos.

65 El tamaño (de partícula) hidrodinámico de LEDGF₁₋₃₂₆ fue de 7 ± 1 nm el día 0 en todas las formulaciones con o sin

aditivos (Figura 11C(i)) como lo indica la DLS. El día 3, el tamaño de partícula de LEDGF₁₋₃₂₆ aumentó a 200-700 nm en formulaciones en tampón puro a un pH de 6-7,5. En presencia de aditivos, LEDGF₁₋₃₂₆ indicó un tamaño de ~ 1 nm el día 0 y no se indicó ningún cambio de tamaño hasta el día 60 (Figura 11C(ii)).

- 5 La SDS-PAGE indicó que LEDGF₁₋₃₂₆ es una proteína de 40 kDa. El día 0 hubo bandas muy débiles de proteínas de pequeño peso molecular en todas las formulaciones. En formulaciones con tampón puro, los fragmentos de menor peso molecular se intensificaron tan pronto como el día 1 (Figura 12(i)). El día 3 había una cantidad significativa de bandas visibles de bajo peso molecular. El día 7 hubo una pérdida completa de la banda de 40 kDa y otros fragmentos. Los aditivos retrasaron la intensificación de las bandas moleculares inferiores hasta el día 60 (Figura 12(ii)). El día 60, se observaron bandas moleculares inferiores junto con la banda de 40 kDa en la formulación que contenía aditivos, independientemente del pH del tampón.

Los aditivos reducen los agregados insolubles de LEDGF₁₋₃₂₆

- 15 El contenido de proteína soluble el día 0 para las formulaciones de LEDGF₁₋₃₂₆ en tampón puro a un pH de 6,0 - 7,5 fue de $417,8 \pm 21,3$ µg/ml (Figura 13A). El día 7 hubo una disminución significativa en el contenido de proteína soluble a $142,5 \pm 60,7$ µg/ml. Después de eso, hubo una gran variación en el contenido de proteínas de las formulaciones en tampón puro a diferentes pH. Sin embargo, no había una tendencia clara. En un promedio, el día 60, el contenido total de proteína soluble fue de $316,2 \pm 140,0$ µg/ml. Las formulaciones que contenían aditivos indicaron un contenido de proteína de $470,5 \pm 17,3$ µg/ml el día 0 y se mantuvo en $469,0 \pm 33,4$ µg/ml incluso hasta el día 60.

El porcentaje de agregados presentes en la formulación se calculó a partir del contenido de proteína soluble (Figura 13B). Las formulaciones en tampón puro indicaban la aparición de agregados insolubles ya el día 3 y el día 7 había un porcentaje de agregados de $64,6 \pm 14,0$ % (Figura 13B). Más allá del día 7 hubo cambios impredecibles en el contenido de agregados en la formulación, sin embargo, la presencia de agregados permaneció significativamente alta en todo el intervalo de pH. En presencia de aditivos, el porcentaje de agregados permaneció por debajo del límite de detección para todos los días hasta el día 60, excepto el día 30, donde hubo un porcentaje de agregados de $22,3 \pm 9$ % (Figura 13B).

- 30 Las partículas que se establecieron en las formulaciones fueron visibles en las formulaciones con tampón puro (Figura 13C), mientras que las formulaciones que contenían aditivos fueron transparentes hasta el día 60.

LEDGF₁₋₃₂₆ permanece inmunorreactivo en presencia de aditivos

- 35 La inmunorreactividad de LEDGF₁₋₃₂₆ se cuantificó usando un ELISA indirecto (Figura 14). El ELISA indicó un $76,9 \pm 4,8$ % de LEDGF₁₋₃₂₆ inmunorreactivo el día 0 en formulaciones con tampón puro a un pH de 6,0 - 7,5. El día 14, cuando se ensayó la inmunoreactividad, se descubrió que LEDGF₁₋₃₂₆ perdió casi toda su inmunoreactividad con solo un $3,1 \pm 2,4$ % restante. El día 60 el LEDGF₁₋₃₂₆ inmunorreactivo era indetectable. Por otro lado, las formulaciones que contenían aditivos, indicaron un porcentaje de $74,8 \pm 7,7$, $66,2 \pm 2,8$ y $70,4 \pm 24,5$ % de LEDGF₁₋₃₂₆ inmunorreactivo, el día 0, el día 14 y el día 60, respectivamente. Se observó que la inmunoreactividad dependía del pH, mientras que un pH de 6 y 7,5 indicó un porcentaje de 30 ± 4 y 58 ± 1 % de LEDGF₁₋₃₂₆ inmunorreactivo, un pH de 6,5, 6,75, 7,0 y 7,25 indicó un porcentaje de 78 ± 15 , 78 ± 45 , 76 ± 9 y 102 ± 13 % de LEDGF₁₋₃₂₆ inmunorreactivo el día 60.

Los aditivos individuales son menos eficaces para aumentar la estabilidad de LEDGF₁₋₃₂₆

- 45 Para comprender el efecto de los aditivos individuales sobre la estabilidad de LEDGF₁₋₃₂₆ se ensayó solo un aditivo a la vez en formulaciones de LEDGF₁₋₃₂₆ (1 mg/ml) a un pH de 7,0 (Figuras 15 y 16). La intensidad de fluorescencia de LEDGF₁₋₃₂₆ a 342 nm disminuyó de 8410 ± 116 a 2178 ± 22 U.R.F. para la formulación en tampón de citrato-fosfato puro el día 30 (Figura 15A). Mientras que para las formulaciones que contenían Tween 20 al 0,01 %, EDTA 1 mM y sacarosa al 10 %, la intensidad de fluorescencia fue de 4925 ± 1249 , 4056 ± 979 y 6370 ± 592 U.R.F., respectivamente el día 30. La azida sódica, utilizada como control para monitorizar la contaminación microbiana, indicó una intensidad de fluorescencia de 9136 ± 241 U.R.F. En ausencia de aditivo, la pérdida de señal de fluorescencia de LEDGF₁₋₃₂₆ fue del 75 % el día 0. El Tween 20, el EDTA y la sacarosa, conservaron la señal de fluorescencia a ~ 59, 48 y 76 %, respectivamente. Similar a la fluorescencia, la señal de DC también indicaba inestabilidad de LEDGF₁₋₃₂₆ (Figura 15B).

El día 30, todas las formulaciones indicaron una diferencia significativa en la elipticidad a 208 nm en comparación con la señal del día 0. Hubo un gran ruido de señal de fondo lo que indicaba la presencia de estructuras no nativas.

- 60 LEDGF₁₋₃₂₆ indicó un tamaño hidrodinámico medio de 7 ± 1 nm un día 0 para todas las formulaciones que aceptan la formulación que contiene sacarosa (Figura 15C). En presencia de sacarosa LEDGF₁₋₃₂₆ indicó un tamaño hidrodinámico de 1 nm. El día 30, el tamaño de partícula aumentó significativamente a 578 ± 366 , 726 ± 444 , 490 ± 423 y 1052 ± 125 nm, en las formulaciones que contenían tampón puro, Tween 20, EDTA y sacarosa, respectivamente. Para el grupo de azida sódica, en lugar de aumentar el tamaño hubo una disminución en el tamaño de 7 a 4 nm.

65

El LEDGF₁₋₃₂₆ nativo monomérico se monitorizó mediante SDS-PAGE (Figura 16). Inicialmente, el día 0, la intensidad de la banda de LEDGF₁₋₃₂₆ a 40 kDa fue similar en todos los grupos. El día 7 hubo una disminución de la banda de 40 kDa lo que indicaba pérdida de monómeros de LEDGF₁₋₃₂₆. El día 14, la aparición de bandas de menor peso molecular en todos los grupos fue más pronunciada en comparación con el día 0.

5

Ejemplo 3

1. Materiales y métodos

10 Las células ARPE-19 se adquirieron en la American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA). Los materiales de cultivo celular, los reactivos y la Lipofectamina 2000 se adquirieron en Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA). El ácido crómico, HCl, NaOH y otros suministros para el microscopio circular se adquirieron en Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). La base Tris, el ZnCl₂ y el EDTA (ácido etilendiaminoteracético) se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

15 **Preparación de nanoensamblajes**

El LEDGF₁₋₃₂₆ liofilizado se dializó ampliamente durante la noche en Tris-HCl 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4 a 4° C. La solución madre de ZnCl₂ (100 mM) se preparó en el mismo tampón. Para la preparación de nanoensamblajes, la solución madre de zinc se diluyó a una concentración final de 0,1 mM, 1 mM y 10 mM usando Tris-HCl 25 mM, NaCl
20 100 mM, pH 7,4 y se añadió LEDGF₁₋₃₂₆ (concentración final 1 mg/ml) y se incubó a 37° C durante 24 h. LEDGF₁₋₃₂₆ sin zinc en condiciones similares se mantuvo como control. Todas las soluciones se filtraron con un filtro de 0,2 µm antes de la preparación de las formulaciones. Nano (xx) ensamblaje indica nanoensamblaje de LEDGF₁₋₃₂₆ preparado con Zn(II) xx mM.

25 **Dispersión dinámica de luz**

La homogeneidad y la distribución del tamaño de los nanoensamblajes se midieron usando zeta sizer Nano ZS (Malvern, Westborough, MA) en función de la dispersión dinámica de luz (DLS). En resumen, la muestra se colocó en una cubeta de cuarzo de 150 µl y se tomaron datos a un ángulo de retrodispersión de 173° con un promedio calculado
30 de once escáneres para la representación gráfica de la distribución de tamaño final. La variación dependiente del tiempo de los tamaños de estos nanoensamblajes y su estabilidad se monitorizaron midiendo el perfil de distribución de tamaño en diferentes puntos de tiempo.

Fluorescencia

35

Los cambios en la estructura terciaria de LEDGF₁₋₃₂₆ se determinaron midiendo la fluorescencia intrínseca del triptófano en estado estacionario. La muestra se colocó en una cubeta de cuarzo de 150 µl y se registraron espectros de emisión de 300 a 400 nm, a una longitud de onda de excitación de 280 nm, con un aumento de 1 nm utilizando Spectramax M5 (Molecular Devices, Downingtown, PA). El número de escáneres por punto de datos fue de 6.

40

Dicroísmo circular

Para determinar los cambios de la estructura secundaria en LEDGF₁₋₃₂₆, se registró el espectro de DC en el UV lejano de las formulaciones. En resumen, la muestra se colocó en una cubeta de cuarzo de 1 mm y los espectros se
45 registraron a una velocidad de exploración de 0,5 segundos por punto de tiempo, a un tamaño de paso de 1 nm y una anchura de banda de 4 nm de 200 a 280 nm, utilizando el instrumento Chirascan® CD (Applied Photophysics Ltd, RU). Todos los escáneres se realizaron por triplicado. Los escáneres se sustrajeron para el componente de tampón.

Ensayos de viabilidad celular

50

Para determinar la función de la supervivencia celular de LEDGF₁₋₃₂₆ en presencia de estrés mediado por agregación se utilizaron células ARPE-19. En resumen, las células ARPE-19 se conservaron como se describió anteriormente (Baid et al. PLoS One. 6(9):e24616). Para el ensayo de viabilidad celular, en una placa de 96 pocillos, 10 000 células se sembraron en suero que contenía medio DMEM-F12. Después de 24 horas, el medio se aspiró y las células se
55 lavaron con 100 µl de medio aséptico. Después de eso, las células se trataron con 200 µl de LEDGF₁₋₃₂₆ solo o con los nanoensamblajes de LEDGF₁₋₃₂₆ + zinc 10 mM durante 48 horas. Sin células (solo los medios), células con tampón Tris 25 mM como control para LEDGF₁₋₃₂₆ solo, células con Tris 25 mM + zinc 10 mM (equivalente al grupo que contenía la mayor cantidad de zinc) se mantuvieron como control. Las células se incubaron durante 24 y 48 horas. Después de eso, el medio se aspiró y se añadieron 200 µl de medio aséptico reciente. A cada uno de los pocillos, se
60 añadieron 20 µl de reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol, 5 mg/ml en PBS pH 7,4) y se realizó una incubación adicional durante 3 horas a 37° C. El medio que contenía MTT se aspiró y el cristal de formazán formado se disolvió en 200 µl de DMSO. La absorbancia del color revelado se midió a 570 nm utilizando Spectramax M5. El porcentaje de viabilidad de los grupos se calculó con referencia al grupo de control que contenía células sin lipofectamina 2000. Todos los grupos se repitieron como n = 3.

65

Captación celular

En una placa de 24 pocillos, células ARPE-19 (50 000) se sembraron en suero que contenía medio DMEM-F12. Después de 24 horas, el medio se aspiró y las células se lavaron con 100 μ l de medio asérico. Después de eso, las células se trataron con 200 μ l de LEDGF₁₋₃₂₆ o con nano(10)ensamblaje durante 1 y 6 horas. Células con tampón Tris 25 mM como control para LEDGF₁₋₃₂₆ solo, células con Tris 25 mM + zinc 10 mM (equivalente al grupo que contenía la mayor cantidad de zinc) se mantuvieron como control. Después de 2 o 6 horas, las células se lavaron dos veces con 500 μ l de PBS frío a un pH de 7,4 seguido de 2 lavados de 500 μ l de PBS ácido a un pH de 5. Después de eso, las células se sometieron a lisis con Tritón-x al 1 % durante 20 minutos a temperatura ambiente y se fragmentaron y recogieron. La fluorescencia se midió a una excitación de 488 nm y a una emisión de 519 nm.

Quelación

Para investigar si la formación de nanoensamblajes podía invertirse en presencia de un agente quelante, se permitió que se formaran los nanoensamblajes durante 24 horas a 37° C como se ha descrito anteriormente. Se preparó solución madre de EDTA 500 mM usando Tris-HCl 25 mM y NaCl 100 mM, pH 7,4. Se añadió EDTA a una concentración final de 50 mM a LEDGF₁₋₃₂₆ o a los nanoensamblajes. Se incubó durante 4 horas a temperatura ambiente, después de lo cual, se calculó la fluorescencia UV y el DC como se ha descrito anteriormente.

2. Resultados

LEDGF₁₋₃₂₆ sufre cambios estructurales y conformacionales en presencia de ZnCl₂

La formación de nanoensamblajes se monitorizó en presencia de Zn(II) mediante dispersión dinámica de luz (DLS), fluorescencia intrínseca del trp, DC en el UV lejano y espectros de UV visible (Figura 17). LEDGF₁₋₃₂₆ indicó un diámetro hidrodinámico de 9 ± 1 nm, que no cambió significativamente en el periodo de 24 horas según monitorización efectuada mediante DLS (Figura 17A). El LEDGF₁₋₃₂₆ incubado con diferentes concentraciones de Zn(II) sufrió un cambio de tamaño, lo que indicaba la formación de nanoensamblajes. Con ZnCl₂ 0,1 mM no hubo cambio de tamaño hasta las 24 horas. En presencia de Zn(II) 1 mM y 10 mM, LEDGF₁₋₃₂₆ indicó un aumento de tamaño a los 30 minutos de incubación a 37° C. A las 24 h de incubación, LEDGF₁₋₃₂₆ indicó un tamaño de 7 ± 1 , 22 ± 5 , 26 ± 5 y 28 ± 5 nm para el control, nano(0,1), nano(1) y nano(10) ensamblajes, respectivamente.

Para investigar los cambios en la estructura secundaria de LEDGF₁₋₃₂₆ en presencia de Zn(II), los espectros de DC en el UV lejano del LEDGF₁₋₃₂₆ se monitorizaron de 200-260 nm (Figura 17B). Después de 24 horas de incubación a 37° C, LEDGF₁₋₃₂₆ indicó una elipticidad negativa por debajo de 200 nm y una caída negativa a 230 nm. La desconvolución de espectros indicó que LEDGF₁₋₃₂₆ era principalmente una estructura enrollada al azar. En presencia de Zn(II) se indicaron cambios significativos en los espectros de DC. La caída negativa a 230 nm se desplazó hacia la izquierda (para reducir la longitud de onda). La elipticidad de LEDGF₁₋₃₂₆ indicó una señal negativa aumentada a medida que aumentaba la concentración de Zn(II). El cambio en el DC dependía de la concentración de Zn(II), siendo lento para la formulación con Zn(II) 0,1 mM y más rápido para la formulación con Zn(II) 10 mM (datos no mostrados). Hubo un desplazamiento en la caída negativa a 230 nm hacia una longitud de onda más baja de una manera dependiente de la concentración, lo que indicaba una posible formación de hélice α . Sin embargo, por debajo de 200 nm, la señal negativa también aumentó dependiendo de la concentración de Zn(II). La desconvolución de espectros de DC indicó un aumento del 2 % en la hélice α en comparación con el control en formulación nano (10).

El espectro de fluorescencia intrínseca del trp de LEDGF₁₋₃₂₆ (Figura 17C) indicaba que en presencia de Zn(II), la intensidad de la señal de fluorescencia disminuía entre 200 - 400 nm en presencia de Zn(II). Curiosamente, la disminución de la señal de fluorescencia fue mayor en la formulación de Zn(II) 0,1 mM en comparación con la formulación de Zn (II) 10 mM.

LEDGF₁₋₃₂₆ mostró una $A_{m\acute{a}x}$ a 276 nm en los espectros de absorbancia UV. (Figura 17D). En presencia de Zn(II) hubo una disminución en la señal de UV para la formulación de Zn(II) 0,1 y 1 mM, pero no se observó ningún cambio para la formulación de zinc 10 mM. La señal de UV a 276 nm ($A_{m\acute{a}x}$) fue de 0,47, 0,33, 0,32 y 0,46 para el control, nano(0,1), nano(1) y nano(10) ensamblajes, respectivamente.

LEDGF₁₋₃₂₆ forma nanoestructuras

Como se muestra en la Figura 18, Cuando los nano (10) ensamblajes de LEDGF₁₋₃₂₆ (panel de la derecha) se visualizaron con microscopía electrónica de transmisión (MET), se observó la presencia de nanoestructuras laxamente formadas, como se aprecia mediante una mancha negativa densa. Algunos nanoensamblajes se aferraban entre sí, mientras que otros estaban presentes como una partícula individual. En ausencia de Zn(II), LEDGF₁₋₃₂₆ (panel central) no indicó la presencia de ninguna de dichas estructuras.

Los nanoensamblajes son estables sobre diluciones

65

La estabilidad de los nanoensamblajes sobre diluciones se estudió utilizando DLS (Figura 10). Una vez formados los nano (10) ensamblajes no indicaron ningún cambio de tamaño cuando se diluyeron 2 y 4 veces. Así mismo, cuando estos nano (10) ensamblajes diluidos se conservaron a 4° C durante 24 horas y después se calculó el tamaño, no hubo cambio de tamaño.

5

La formación del nanoensamblaje es reversible

Para investigar el tipo de interacción entre el LEDGF₁₋₃₂₆ y el zinc, se monitorizó el efecto de EDTA sobre el nano (10) (Figura 19). La adición de EDTA para controlar LEDGF₁₋₃₂₆ no indicó ningún cambio de tamaño significativo y el tamaño de LEDGF₁₋₃₂₆ permaneció a ~ 7-8 nm (Figura 19A). Antes de añadir EDTA, el nano (10) ensamblaje indicó un tamaño de 25 ± 4 que disminuyó a 9 ± 2 después de la adición de EDTA. El espectro de fluorescencia del nanoensamblaje que se extinguió debido a la formación del nanoensamblaje se retroinvirtió (Figura 19B). Después de la adición de EDTA, el control y los nano (10) ensamblajes indicaron un espectro de fluorescencia similar. Todos los cambios en la estructura secundaria, según lo indicado por el espectro de DC, se invirtieron de manera similar (Figura 19C). El espectro UV visible también indicó la inversión de los cambios que se produjo debido a la formación del ensamblaje (Figura 19D).

10

15

La estabilidad de LEDGF₁₋₃₂₆ aumenta en los nanoensamblajes

La estabilidad de LEDGF₁₋₃₂₆ en nanoensamblajes a 25° C, se monitorizó durante 30 días utilizando DLS, SDS-PAGE, DC y fluorescencia (Figura 20). El tamaño de LEDGF₁₋₃₂₆ de control disminuyó de 8 ± 1 a 5 ± 1 nm el día 3 (Figura 20A). Los nano (1) ensamblajes indicaron un tamaño de 27 ± 1 el día 0 que disminuyó a 4 ± 3 nm el día 7. Por otro lado, los nano (10) ensamblajes no indicaron cambios de tamaño hasta el día 30. El día 30 hubo un cambio de tamaño de 27 ± 1 a 8 ± 2 nm para los nano (10) ensamblajes.

20

25

Se indicó una banda de 40 kDa en SDS-PAGE en el LEDGF₁₋₃₂₆ de control, en los nano (1) y nano (10) ensamblajes el día 0 (Figura 20B). El día 3 hubo una pérdida completa de esta banda en el LEDGF₁₋₃₂₆ de control. Los nano (1) ensamblajes perdieron esta banda el día 7, mientras que el nano (10) la perdió el día 30.

El espectro de DC del LEDGF₁₋₃₂₆ de control indicó una pérdida continua en elipticidad negativa desde el día 1 en adelante y una pérdida completa de señal el día 30 (Figura 20C). Los nano (1) ensamblajes indicaron una pérdida continua de señal de DC desde el día 1 en adelante; sin embargo hasta el día 30 hubo señal de DC. No hubo pérdida de señal significativa en los nano (10) ensamblajes hasta el día 14, el día 30 hubo disminución en la señal de DC, sin embargo, se seguía observando la señal negativa distintivamente.

30

35

El espectro de fluorescencia del LEDGF₁₋₃₂₆ de control, indicó una disminución significativa en la intensidad de fluorescencia el día 7 en comparación con el día 0, la pérdida adicional de fluorescencia continuó el día 30 (Figura 20D). Por otro lado, los nano (1) ensamblajes indicaron que no había pérdida en las señales de fluorescencia hasta el día 7 en comparación con las señales del día 0, sin embargo, el día 14 y en adelante hubo una pérdida de señal.

Siendo el nano (10) el más fuerte, indicó que no hubo pérdida de intensidad hasta el día 14 en comparación con el día 0 señal y muy poca disminución en la intensidad el día 30 en comparación con otros grupos correspondientes.

40

Las células ARPE-19 captan una mayor cantidad de nanoensamblajes

La captación celular de LEDGF₁₋₃₂₆ se investigó en células ARPE-19 usando LEDGF₁₋₃₂₆ conjugado con Alexa (Figura 21). La captación de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ por las células ARPE-19 fue dependiente de la dosis. A las 2 horas, las células ARPE-19 habían captado 0,5 ± 0,1, 1,0 ± 0,3 y 1,4 ± 0,2 µg de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ (control) cuando se incubaron con 2, 10 y 25 µg/ml de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆, respectivamente. Cuando el tiempo de incubación se aumentó a 6 h, hubo un aumento en la captación de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆. La captación de LEDGF₁₋₃₂₆ aumentó a 1,2 ± 0,2, 1,2 ± 0,2 y 1,9 ± 0,2 µg en 6 horas para el tratamiento con 2, 10 y 25 µg/ml de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆, respectivamente.

45

50

Los nano (10) ensamblajes de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ indicaron una mayor captación a las 2 y 6 horas en comparación con los grupos de control correspondientes. A las 2 h hubo una captación de 0,7 ± 0,08, 1,0 ± 0,2 y 2,2 ± 0,5 µg para el tratamiento con 2, 10 y 25 µg/ml de nano (10) ensamblaje, respectivamente. Aunque la captación del nanoensamblaje fue mayor en comparación con el control, no hubo diferencia significativa. El aumento del tiempo de incubación de 2 horas a 6 horas aumentó significativamente la captación del nano (10) ensamblaje. La captación fue de 2,0 ± 0,09, 2,9 ± 0,5 y 2,9 ± 0,2 µg a las 6 horas para el tratamiento con 2, 10 y 25 µg/ml de nano (10) ensamblaje, respectivamente.

55

Los nanoensamblajes rescatan a las células ARPE-19 de la inanición sérica

60

La eficacia de los nanoensamblajes para rescatar a las células ARPE-19 de la inanición sérica se comprobó mediante ensayo con MTT. (Figura 22). En comparación con los grupos no tratados (viabilidad del 100 %), El grupo tratado con LEDGF₁₋₃₂₆ indicó un aumento en la viabilidad de una manera dependiente de la dosis. La viabilidad de las células de ARPE-19 aumentó a 124 ± 11, 148 ± 12 y 160 ± 44 % con el tratamiento de 0,01, 0,1 y 1,0 µg/ml de LEDGF₁₋₃₂₆, respectivamente. Los grupos tratados con nano (10) ensamblajes indicaron una mayor viabilidad celular en

65

comparación con los grupos tratados con LEDGF₁₋₃₂₆ de control correspondientes. La viabilidad de las células de ARPE-19 aumentó a 150 ± 3 , 180 ± 22 y 200 ± 8 % con el tratamiento de 0,01, 0,1 y 1,0 $\mu\text{g/ml}$ de LEDGF₁₋₃₂₆, respectivamente.

5 **Los nanoensamblajes aumentan a eficacia de LEDGF₁₋₃₂₆ para retrasar la degeneración retiniana**

La eficacia de los nanoensamblajes para impedir la pérdida funcional en la retina se ensayó en ratas RCS usando electroretinografía (ERG) (Figura 23A). La semana 4, antes de la inyección intravítrea dada a las ratas, la amplitud de la onda b era de 313 ± 32 μV , sin diferencia significativa en ninguno de los grupos. Durante un período de 10 semanas posteriores, es decir, a la semana 14, el grupo tratado con tampón y el grupo tratado con Zn(II) indicaron una disminución en la amplitud de la onda b de 307 ± 44 a 17 ± 10 y 302 ± 37 a 11 ± 7 μV , respectivamente. El tratamiento con LEDGF₁₋₃₂₆ (control) redujo la pérdida de la amplitud de la onda b y a la semana 14 la amplitud de la onda b disminuyó de 337 ± 30 a 42 ± 15 μV , sin embargo, no hubo diferencia significativa en el grupo tratado con tampón, Zn(II) y control en la amplitud de la onda b en la semana 14. El nano (10) indicó una protección significativa contra la pérdida de la amplitud de la onda b hasta la semana 14. La amplitud de la onda b disminuyó de 305 ± 36 a 65 ± 15 μV a la semana 14, lo que indicaba una onda b significativamente alta en comparación con el grupo tratado con tampón o con Zn(II), correspondiente.

A la semana 4, la amplitud de la onda b de todos los grupos fue de 105 ± 23 en el ERG fotópico (Figura 23B). Similar al ERG escotópico, se observó una disminución en la amplitud de la onda b. Los grupos tratados con tampón y Zn (II) indicaron una pérdida en la amplitud de la onda b de 94 ± 26 a 12 ± 7 y 109 ± 23 a 11 ± 7 μV , respectivamente. El grupo tratado con LEDGF₁₋₃₂₆ de control y el grupo tratado con nano (10) ensamblajes retrasó la pérdida, y la amplitud de la onda b disminuyó de 100 ± 28 a 22 ± 5 y 113 ± 23 a 40 ± 10 μV , respectivamente. Los nano (10) ensamblajes indicaron una onda b significativamente más alta en comparación con grupo tratado con tampón, Zn(II) y LEDGF₁₋₃₂₆ de control correspondiente.

Además, la amplitud del potencial oscilatorio (PO) en todos los grupos fue de $91,8 \pm 11,5$ μV la semana 4. (Figura 23C). Se observó una disminución en la amplitud (PO) en todos los grupos. La semana 14, la amplitud PO era de 32 ± 5 , 33 ± 8 , 36 ± 8 y 36 ± 9 μV , en el grupo tratado con tampón, Zn(II), control y nano (10) ensamblaje, respectivamente. No hubo diferencias significativas en ninguno de los grupos.

También se midió la amplitud de parpadeo de 30 hz. (Figura 23D). La semana 4, la amplitud de parpadeo fue en promedio 10 ± 2 μV para todos los grupos. Al igual que con cualquier otro ERG, hubo una disminución en la amplitud de parpadeo en todos los grupos; sin embargo, la semana 14, la amplitud de parpadeo del grupo tratado con nano (10) ensamblaje fue significativamente mayor que la del grupo tratado con tampón y el grupo tratado con Zn (II). Los valores de amplitud de parpadeo la semana 14 fueron de $2 \pm 0,4$, $3,7 \pm 0,4$, $2,4 \pm 0,6$, $5,2 \pm 2,2$ μV para los grupos tratados con tampón, Zn(II), control y nano (10), respectivamente.

En nanoensamblaje aumenta la persistencia de LEDGF₁₋₃₂₆ durante días en tejidos oculares

La persistencia de LEDGF₁₋₃₂₆ en ratas SD normales se midió usando la señal de fluorescencia de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ (Figura 24). La Figura 24A indica un promedio de escaneo en blanco ($n = 7$) antes de la inyección intravítrea del ojo de rata SD. El escaneo en blanco indicó auto fluorescencia de la coroides, cristalino y córnea a aproximadamente 24, 50 y 88 puntos de datos, respectivamente. En función de este escaneo en blanco, se asignaron puntos de datos a varios tejidos del ojo. Los puntos de datos asignados fueron coroides-EPR-24, humor vítreo ~ 40, cristalino-50, humor acuoso ~ 70 y córnea-88. Las Figuras 24B y 32C muestran la curva estándar para el control y nano (10) ensamblaje. Esto se utilizó para transformar la señal de fluorescencia, obtenida en términos de concentración (ng/ml) de fluoresceína sódica (NaF) de los escáneres con Flurotrón, a concentración ($\mu\text{g/ml}$) real de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆. Las Figuras 24D y 24E son escáneres con Flurotrón ($N = 4$) de grupos tratados con control y con nano (10) ensamblaje de 2 min a 14 días después de la inyección intravítrea. La señal de fluorescencia en la región vítrea, la coroides-EPR (epitelio pigmentario retiniano) y el humor acuoso, se obtuvieron de escáneres con Flurotrón (Figura 24D y 24E) y se transformó a concentración real de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ en las Figuras 24F, 24G y 24H, respectivamente. Un pico alto en la región vítrea a los 2 minutos de inyección en las Figuras 24C y 24D indicó que la inyección intravítrea se realizó correctamente.

Se observó una señal de fluorescencia equivalente a $3 \pm 0,5$ ng/ml de NaF en la región vítrea en escáneres en blanco (Figura 24A) que después de transformarse dio como resultado 0 $\mu\text{g/ml}$ de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ como valor de referencia. Después de 2 minutos de la inyección intravítrea, se indicó un valor máximo de 292 ± 106 $\mu\text{g/ml}$ de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ en la región vítrea para el grupo tratado con control, que disminuyó bruscamente a 127 ± 74 $\mu\text{g/ml}$ en 30 minutos (Figura 24F). El día 3, el pico de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ en los grupos tratados con control estaba por debajo del valor de referencia. Por otro lado, el nano (10) ensamblaje, indicó días de persistencia. La concentración máxima después de 2 minutos de inyección fue de 321 ± 54 $\mu\text{g/ml}$ de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆, hubo un rápido descenso inicial a 100 ± 45 $\mu\text{g/ml}$ en 30 minutos; después de eso, la disminución fue lenta en comparación con el grupo de control y se indicó la persistencia del nanoensamblaje en la región vítrea hasta el día 14. El día 14, la concentración de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ fue de $0,7 \pm 0,1$ $\mu\text{g/ml}$ en el grupo tratado con nano (10) ensamblaje, que fue significativamente más alta que en el

grupo de control y de referencia.

La persistencia de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ también se indicó en la coroides-RPE así como en humor acuoso para el grupo tratado con nano (10) ensamblaje. La auto fluorescencia en la coroides-RPE indicó 10 ± 4 ng/ml de NaF, que cuando se transformó a la concentración de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ fue de $0,1 \mu\text{g/ml}$. Por lo tanto, se consideró que $0,1 \mu\text{g/ml}$ de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ era el valor de referencia para la coroides-RPE (Figura 24G). Poco después de la inyección intravítrea de $13,2 \pm 10,8 \mu\text{g/ml}$ de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ se indicó que en el grupo de control, en la coroides-RPE aumentó a $30,0 \pm 22,6 \mu\text{g/ml}$ en 30 minutos. Después de eso, hubo disminución en el nivel de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ y era indetectable el día 1. Por otro lado, el nano (10) ensamblaje, indicó $14,3 \pm 9,8 \mu\text{g/ml}$ de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ en 2 min que aumentó a $21,5 \pm 12,8 \mu\text{g/ml}$ en 30 min. El día 1 el nivel de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ bajó a $2,0 \pm 1,1 \mu\text{g/ml}$, sin embargo, un grupo de control, fue significativamente alto desde el valor de referencia. El nivel de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ permaneció significativamente alto hasta el día 14 y se detectó que era de $0,6 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$ el día 14.

En el humor acuoso, el valor de referencia calculado a partir del escáner en blanco era equivalente a $0 \mu\text{g/ml}$ de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ (Figura 24A). Dos minutos después de la inyección intravítrea, la concentración de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ fue de $3,4 \pm 3$ y $4,9 \pm 2,4 \mu\text{g/ml}$ para el grupo tratado con control y el grupo tratado con nano (10) ensamblaje (Figura 24H). Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ cayó por debajo del valor de referencia a las 6 horas en el grupo tratado con control, mientras que el grupo tratado con nano (10) ensamblaje indicó la presencia de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ hasta el día 14, en este punto de tiempo, la concentración de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ fue de $0,6 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$.

LEDGF₁₋₃₂₆ permanece inmunorreactivo in vivo durante días cuando se dosifica como un nanoensamblaje

Mediante un ensayo ELISA indirecto (Figura 25), se investigó la inmunoreactividad de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ en diversos varios tejidos oculares y en sangre después de 14 días de una sola inyección intravítrea. No había ningún nivel detectable de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ en la córnea, el humor acuoso, el cristalino, el humor vítreo, la retina, la coroides-RPE, la esclerótica y la sangre de los tejidos oculares blanco no inyectados, lo que indica la ausencia de cualquier cantidad detectable de LEDGF₁₋₃₂₆ endógeno. Curiosamente, Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ fue detectable en la retina tanto en el grupo tratado con control como en el grupo tratado con nano (10) ensamblaje, siendo de $0,2 \pm 0,2$ y $1,3 \pm 0,4 \mu\text{g/g}$ de peso de tejido, respectivamente. No hubo diferencias significativas en el grupo tratado con control y el grupo en blanco, mientras que el tratado con nano (10) ensamblaje tenía una cantidad significativamente mayor de Alexa-LEDGF₁₋₃₂₆ en comparación con el grupo tratado con control o con el grupo en blanco.

Ejemplo 4

Ensayo de recuento de células vivas/muertas - Para el ensayo de recuento celular, en una placa de 96 pocillos se sembraron 10 000 células ARPE-19 y se incubaron durante 24 horas. (Figura 26). Después de 24 horas, se aspiró el medio que contenía suero. Los grupos de ensayo (pP23H-Rho + LEDGF₁₋₃₂₆) se transfectaron transitoriamente con el plásmido pP23H-Rho ($1 \mu\text{g/ml}$) usando una relación de 1: 3 de lipofectamina 2000 (LP-2000) en medio asérico siguiendo el protocolo del fabricante. Después de seis horas de transfección, el medio se aspiró y las células se trataron con una cantidad en aumento de LEDGF₁₋₃₂₆. Sin células (solo el medio), células sin LP-2000 y células con LP-2000 también se conservaron como control. Al final del período de tratamiento con LEDGF₁₋₃₂₆, las células se lavaron con PBS. Las células se marcaron con una combinación de permeante de membrana plasmática (Hoechst 33342), una molécula impermeable a la membrana plasmática (BOBOTM3) y un colorante nuclear (4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato, DAPI). Los núcleos celulares se marcaron con Hoechst 33342, mientras que las células muertas o moribundas, se marcaron con BOBOTM3. Las células se visualizaron usando el sistema de obtención de imágenes de alto contenido Operetta®. El recuento celular se obtuvo utilizando una herramienta informática automatizada en el instrumento Operetta®. El número y porcentaje de células vivas se calcularon restando el recuento de células muertas del recuento de "todas las células". Como se muestra en la Figura 26, LEDGF₁₋₃₂₆ aumenta la viabilidad celular de ARPE-19.

Inmunotransferencia: Para la inmunotransferencia, se usó P23H-Rho etiquetada con CFP (pP23H-CFP-Rho) en lugar de P23H-Rho para la transfección. Células ARPE-19 se sembraron en placas de 60 mm; la transfección y el tratamiento farmacológico aumentaron proporcionalmente en relación con el estudio en la placa de 96 pocillos. Después de finalizar el tratamiento con LEDGF₁₋₃₂₆, las células se lavaron una vez con PBS frío y se sometieron a lisis mediante ultrasonido en tampón RIPA que contenía inhibidor de proteasa. Se cargó la misma cantidad de sobrenadante en el gel de SDS-PAGE y se inmunotransfirió para detectar Hsp70, Hsp40, Hsp27, CFP (para P23H-CFP-Rho) y LEDGF₁₋₃₂₆ y β -actina. Las bandas de proteínas se visualizaron usando el kit de detección de quimioluminiscencia ECLTM mejorado (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Los datos observados indicaron que LEDGF₁₋₃₂₆ estaba internalizado

Ensayo fagocítico - Células ARPE-19 se sembraron en placas de 24 pocillos y se transfectaron con 20 pM/ml de ARNip de MERTK (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX), utilizando el agente transfectante de ARNip (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX) durante 6 horas. El medio de transfección se retiró y las células se incubaron adicionalmente en medio asérico durante 24 horas. Las células transfectadas solo con el medio de transfección y sin ARNip de MERTK, se conservaron como control. Las células se lavaron una vez y se trataron con $0,05$, $0,5$ o $5 \mu\text{g/ml}$

de LEDGF₁₋₃₂₆ durante 24 horas y después se monitorizó la fagocitosis de partículas de 2 µm. En resumen, durante 3 horas, 100 µg/ml de Fluoesferas azules de 2 µm (Life Technologies, Grand Island, NY) se incubaron con las células. Después de eso, las células se lavaron dos veces con PBS frío a un pH de 7,4, seguido de dos lavados con PBS frío a un pH de 5,0 para eliminar las fluoesferas adherentes. Las células se sometieron a lisis usando Tritón-x al 1 %, y la fluorescencia de las partículas en el lisado celular se midió usando una excitación a 350 nm y una emisión a 430nm. Para determinar la captación de las partículas, células transfectadas solo con agente transfectante sin ARNip, se tomaron como control. Se utilizaron células sin tratamiento de partículas para las mediciones de fluorescencia de fondo. Como se muestra en la Figura 27, LEDGF₁₋₃₂₆ aumenta la actividad fagocítica. La disminución de la fagocitosis de las células epiteliales del pigmento retiniano es un sello distintivo de diversas enfermedades retinianas, incluidas las enfermedades degenerativas. LEDGF₁₋₃₂₆ será útil en el tratamiento de enfermedades con fagocitosis deteriorada.

Histología: Al final del estudio, es decir, a la semana 12, los ojos se enuclearon después de las mediciones de ERG y se fijaron en el fijador de Davidson (2 % de formaldehído al 37-40 %, etanol al 35 %, ácido acético puro al 10 % y agua destilada al 53 %) durante 24 horas a temperatura ambiente. Después, los ojos se conservaron en etanol al 70 % para su posterior deshidratación en serie e inclusión en parafina. En un microtomo estándar, se cortaron tres secciones verticales de 6 µm de grosor desde el lado nasal al temporal en el nervio óptico (con una separación de 500 µm). La morfología retiniana macroscópica se evaluó con un microscopio óptico después de teñir con hematoxilina/eosina las secciones tisulares. El espesor de la capa nuclear externa (CNE) y de la capa nuclear interna (CNI) se midió metódicamente utilizando el programa informático Aperio ImageScope v11.1.2.760. Como la protección de la célula fotorreceptora puede ser irregular sobre la retina, en cada sección se analizaron 500 µm desde el borde superior hasta el borde inferior y en cada punto se calculó el promedio de tres secciones. Los datos representan el promedio de tres ojos. Como se muestra en la Figura 28, LEDGF₁₋₃₂₆ retrasa la pérdida de los dos fotorreceptores nucleares de la retina.

Inmunofluorescencia: Para la inmunofluorescencia, después de eliminar la parafina, se procesaron secciones oculares a través de las siguientes etapas secuenciales a temperatura ambiente, a menos que se indique lo contrario. El antígeno se recuperó hirviendo las secciones a 80° C durante 15 min. Después de bloquear la unión inespecífica, las secciones se incubaron durante la noche con anticuerpo primario de ratón anti-rodopsina (1D4) a 4° C y después se incubaron durante 30 minutos con anticuerpo de burro anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor® 594 y DAPI. Por último, las secciones oculares se lavaron y se montaron con medio de montaje Supermount H (Biogenex, San Ramon, CA) para impedir la pérdida rápida de fluorescencia. La fluorescencia se visualizó utilizando un microscopio confocal (Nikon Eclipse CI) con un zoom óptico de 20X. Las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas para DAPI y Alexa Fluor fueron 408-450 35 y 637-605/75 nm, respectivamente. Las imágenes se capturaron con el programa informático Nikon EZ-C1 versión 3.40. Como se muestra en la Figura 29, LEDGF₁₋₃₂₆ retrasa la pérdida del segmento exterior del bastón.

Ejemplo 5

Liberación acumulativa *in vitro* de His-LEDGF₁₋₃₂₆

His-LEDGF₁₋₃₂₆ encapsulado en NPinPMP se evaluó con respecto a la liberación *in vitro* en PBS a un pH de 7,4. Las partículas (2-3 mg) se pesaron y dispersaron en 1 ml de PBS pH 7,4 y se incubaron a 37° C con agitación a 200 rpm (incubador con agitador Max Q). En puntos de tiempo predeterminados, las partículas suspendidas se centrifugaron a 13 000 g durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante. El sedimento que comprendía las partículas, se resuspendió en 1 ml de PBS reciente pH 7,4 y se incubó. El contenido de His-LEDGF₁₋₃₂₆ en las muestras se calculó utilizando el ensayo de micro BCA siguiendo las instrucciones del fabricante (Pierce Biotechnology, IL, Estados Unidos). Los datos acumulativos *in vitro* mostraron la liberación sostenida de His-LEDGF₁₋₃₂₆ de NPinPMP. Como se muestra en la Figura 30, al cabo de 3 meses, se observó una liberación acumulativa de His-LEDGF₁₋₃₂₆ del 60 %.

Suministro *in vivo* de His-LEDGF₁₋₃₂₆ en ratas

El suministro *in vivo* de His-LEDGF₁₋₃₂₆ se evaluó después de la administración intravítrea de His-LEDGF₁₋₃₂₆ conjugado con Alexa Fluor 488 en NPinPMP en un modelo de rata. En la NPinPMP se usó LEDGF₁₋₃₂₆ sin etiqueta. Los ojos de la rata recibieron una inyección de Alexa-His-LEDGF₁₋₃₂₆ encapsulado en NPinPMP (6,0 µg de His-LEDGF₁₋₃₂₆/5 µl) y como control se inyectó Alexa-His-LEDGF₁₋₃₂₆ = a una concentración equivalente (1,5 µg de proteína marcada y 4,5 µg de proteína no marcada/5 µl). Esta relación permitió comenzar con una intensidad de fluorescencia similar en ambos grupos. La fluorescencia ocular debida a la liberación de Alexa-His-LEDGF₁₋₃₂₆ se monitorizó periódicamente usando Fluorotron Master™ (Ocumetrics, CA, Estados Unidos) hasta que la fluorescencia alcanzó el límite de detección inferior o el valor de referencia. Los valores de referencia de la fluorescencia de los ojos se monitorizaron antes de inyectar las formulaciones. En cada punto de tiempo, se tomaron tres escáneres fluorométricos y se utilizó el valor medio. Se obtuvo la curva estándar para Alexa-His-LEDGF₁₋₃₂₆ a diferentes concentraciones usando una cubeta y una fluorofotometría ocular con un adaptador de cristalino de rata. La curva estándar se utilizó para transformar las concentraciones equivalentes de fluoresceína proporcionadas por el fluorofotómetro a una concentración real de Alexa-His-LEDGF₁₋₃₂₆.

Después de la inyección intravítrea de Alexa-His-LEDGF₁₋₃₂₆ encapsulado en NPinPMP y Alexa-His-LEDGF₁₋₃₂₆

soluble, la distribución de las concentraciones de His-LEDGF₁₋₃₂₆ a lo largo del eje óptico ocular se determinó indirectamente midiendo la curva de distribución de intensidad de fluorescencia alexa (equivalente a la concentración de fluoresceína sódica) a lo largo de los planos axiales, indicados como puntos de datos en una dirección anterior a la posterior. Los escáneres de fluorescencia revelaron un suministro sostenido de Alexa-His-LEDGF₁₋₃₂₆ de NPInPMP en comparación con la solución. Las concentraciones equivalentes de fluoresceína presentadas por Fluorotron Master se transformaron a concentraciones de Alexa-His-LEDGF₁₋₃₂₆. La concentración de Alexa-His-LEDGF₁₋₃₂₆ se representó gráficamente en la región vítrea a partir del grupo tratado con solución y del grupo tratado con NPInPMP en diferentes puntos de tiempo. Solo se presentan las concentraciones de bevacizumab marcado. Antes de la inyección intravítrea, se tomaron las lecturas de fluorescencia de los valores de referencia de los ojos normales y se encontró que la concentración de fluorescencia de los valores de referencia era de 2,03 µg / ml. Como se muestra en la Figura 31, la solución de Alexa-His-LEDGF₁₋₃₂₆ inyectada grupo mostró una concentración de Alexa-His-LEDGF₁₋₃₂₆ de 2,02 µg/ml el día 1, lo que indica una rápida eliminación de la región vítrea. En el grupo que recibió la inyección de NPInPMP, la concentración inicial de Alexa-His-LEDGF₁₋₃₂₆ en la región vítrea fue de 18,23 µg/ml y la concentración de Alexa-His-LEDGF₁₋₃₂₆ por encima del valor de referencia se mantuvo hasta el día 35 y alcanzó niveles normales del valor de referencia al cabo de 50 días. Los datos observados indican la capacidad de conseguir una liberación sostenida *in vivo* de Alexa-His-LEDGF₁₋₃₂₆ de una composición PinP ejemplar.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> The Regents of the University of Colorado, a body corporate
Kompella, Uday B.
Baid, Rinku
Upadhyay, Arun K.
Yandrapu, Sarath
- 25 <120> Péptidos de LEDGF y formulaciones de los mismos para el tratamiento de trastornos degenerativos
- <130> COL-0101WP
- 30 <150> US 61/649,847
<151> 21-5-2012
- <160> 6
- 35 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
<211> 360
<212> PRT
- 40 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> *Homo sapiens*
- 45 <400> 1

ES 2 791 251 T3

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg
 20 25 30

Gly Ser Met Thr Arg Asp Phe Lys Pro Gly Asp Leu Ile Phe Ala Lys
 35 40 45

Met Lys Gly Tyr Pro His Trp Pro Ala Arg Val Asp Glu Val Pro Asp
 50 55 60

Gly Ala Val Lys Pro Pro Thr Asn Lys Leu Pro Ile Phe Phe Phe Gly
 65 70 75 80

Thr His Glu Thr Ala Phe Leu Gly Pro Lys Asp Ile Phe Pro Tyr Ser
 85 90 95

Glu Asn Lys Glu Lys Tyr Gly Lys Pro Asn Lys Arg Lys Gly Phe Asn
 100 105 110

Glu Gly Leu Trp Glu Ile Asp Asn Asn Pro Lys Val Lys Phe Ser Ser
 115 120 125

Gln Gln Ala Ala Thr Lys Gln Ser Asn Ala Ser Ser Asp Val Glu Val

ES 2 791 251 T3

130	135	140																	
Glu	Glu	Lys	Glu	Thr	Ser	Val	Ser	Lys	Glu	Asp	Thr	Asp	His	Glu	Glu				
145					150					155				160					
Lys	Ala	Ser	Asn	Glu	Asp	Val	Thr	Lys	Ala	Val	Asp	Ile	Thr	Thr	Pro				
				165					170					175					
Lys	Ala	Ala	Arg	Arg	Gly	Arg	Lys	Arg	Lys	Ala	Glu	Lys	Gln	Val	Glu				
			180					185					190						
Thr	Glu	Glu	Ala	Gly	Val	Val	Thr	Thr	Ala	Thr	Ala	Ser	Val	Asn	Leu				
		195					200					205							
Lys	Val	Ser	Pro	Lys	Arg	Gly	Arg	Pro	Ala	Ala	Thr	Glu	Val	Lys	Ile				
210						215					220								
Pro	Lys	Pro	Arg	Gly	Arg	Pro	Lys	Met	Val	Lys	Gln	Pro	Cys	Pro	Ser				
225					230					235					240				
Glu	Ser	Asp	Ile	Ile	Thr	Glu	Glu	Asp	Lys	Ser	Lys	Lys	Lys	Gly	Gln				
				245					250					255					
Glu	Glu	Lys	Gln	Pro	Lys	Lys	Gln	Pro	Lys	Lys	Asp	Glu	Glu	Gly	Gln				
			260					265					270						
Lys	Glu	Glu	Asp	Lys	Pro	Arg	Lys	Glu	Pro	Asp	Lys	Lys	Glu	Gly	Lys				
		275					280					285							
Lys	Glu	Val	Glu	Ser	Lys	Arg	Lys	Asn	Leu	Ala	Lys	Thr	Gly	Val	Thr				
	290					295					300								
Ser	Thr	Ser	Asp	Ser	Glu	Glu	Glu	Gly	Asp	Asp	Gln	Glu	Gly	Glu	Lys				
305					310					315					320				
Lys	Arg	Lys	Gly	Gly	Arg	Asn	Phe	Gln	Thr	Ala	His	Arg	Arg	Asn	Met				
				325					330					335					
Leu	Lys	Gly	Gln	His	Glu	Lys	Glu	Ala	Ala	Asp	Arg	Lys	Arg	Lys	Gln				
			340					345					350						
Glu	Glu	Gln	Met	Glu	Thr	Glu	Gln												
		355					360												

<210> 2
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> *Homo sapiens*

<400> 2

5

ES 2 791 251 T3

Met Thr Arg Asp Phe Lys Pro Gly Asp Leu Ile Phe Ala Lys Met Lys
 1 5 10 15

Gly Tyr Pro His Trp Pro Ala Arg Val Asp Glu Val Pro Asp Gly Ala
 20 25 30

Val Lys Pro Pro Thr Asn Lys Leu Pro Ile Phe Phe Phe Gly Thr His
 35 40 45

Glu Thr Ala Phe Leu Gly Pro Lys Asp Ile Phe Pro Tyr Ser Glu Asn
 50 55 60

Lys Glu Lys Tyr Gly Lys Pro Asn Lys Arg Lys Gly Phe Asn Glu Gly
 65 70 75 80

Leu Trp Glu Ile Asp Asn Asn Pro Lys Val Lys Phe Ser Ser Gln Gln
 85 90 95

Ala Ala Thr Lys Gln Ser Asn Ala Ser Ser Asp Val Glu Val Glu Glu
 100 105 110

Lys Glu Thr Ser Val Ser Lys Glu Asp Thr Asp His Glu Glu Lys Ala
 115 120 125

Ser Asn Glu Asp Val Thr Lys Ala Val Asp Ile Thr Thr Pro Lys Ala
 130 135 140

Ala Arg Arg Gly Arg Lys Arg Lys Ala Glu Lys Gln Val Glu Thr Glu
 145 150 155 160

Glu Ala Gly Val Val Thr Thr Ala Thr Ala Ser Val Asn Leu Lys Val
 165 170 175

Ser Pro Lys Arg Gly Arg Pro Ala Ala Thr Glu Val Lys Ile Pro Lys
 180 185 190

Pro Arg Gly Arg Pro Lys Met Val Lys Gln Pro Cys Pro Ser Glu Ser
 195 200 205

Asp Ile Ile Thr Glu Glu Asp Lys Ser Lys Lys Lys Gly Gln Glu Glu
 210 215 220

Lys Gln Pro Lys Lys Gln Pro Lys Lys Asp Glu Glu Gly Gln Lys Glu

ES 2 791 251 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

5

<400> 6

agcaagaagc ttctactgct cagtttccat ttgttcctc

39

REIVINDICACIONES

1. Un péptido purificado, que es un fragmento del factor de crecimiento derivado del epitelio del cristalino (LEDGF) de longitud completa, teniendo el péptido una pureza igual o superior al 90 % cuando se cuantifica por SDS-PAGE y SEC-HPLC y consistiendo en los aminoácidos 1-326 del extremo N-terminal de LEDGF, que es LEDGF₁₋₃₂₆ (SEQ ID NO: 2), o en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una secuencia con una identidad de al menos el 85 %, una secuencia con una identidad de al menos el 90 % y una secuencia con una identidad de al menos el 95 %, con la secuencia de aminoácidos de LEDGF₁₋₃₂₆ (SEQ ID NO: 2).
- 10 2. El péptido purificado de la reivindicación 1, en donde el péptido es LEDGF₁₋₃₂₆ (SEQ ID NO: 2),
3. El péptido purificado de la reivindicación 1, en donde el péptido es un péptido más grande que LEDGF₁₋₃₂₆ (SEQ ID NO: 2).
- 15 4. Una composición que comprende el péptido purificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el péptido está unido o asociado a una nanopartícula metálica coloidal.
5. La composición de la reivindicación 4, en donde la nanopartícula metálica coloidal se selecciona del grupo que consiste en: una nanopartícula metálica coloidal de gadolinio, oro, plata, aluminio, rutenio, zinc, hierro, níquel, calcio, litio, sodio, magnesio, potasio, escandio, titanio, vanadio, cromo, manganeso, cobalto, cobre, galio, estroncio, niobio, molibdeno, paladio, indio, estaño, tungsteno, renio y platino.
- 20 6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en donde el péptido está unido o asociado a una nanopartícula metálica coloidal de zinc
- 25 7. Una composición que comprende el péptido purificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el péptido está unido a, o encapsulado en, una partícula interna, y en donde la partícula interna está cargada en una partícula externa porosa.
- 30 8. La composición de la reivindicación 7, en donde la partícula interna está fabricada con un material de partículas que no se expande en dióxido de carbono supercrítico.
9. Una composición que comprende el péptido LEDGF₁₋₃₂₆ purificado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 anteriores, Tween 20, sacarosa y EDTA.
- 35 10. Una composición farmacéutica que comprende el péptido purificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4, 7 o 9, y un portador, diluyente, excipiente farmacéutico, o combinación de los mismos.
- 40 11. El péptido purificado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, para su uso como medicamento.
12. El péptido purificado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por la agregación de proteínas.
- 45 13. El péptido purificado o la composición para su uso según la reivindicación 12, en donde la enfermedad mediada por la agregación es una enfermedad ocular.
- 50 14. El péptido purificado para su uso según la reivindicación 13, en donde la enfermedad ocular es degeneración macular relacionada con la edad o retinitis pigmentosa.

Inmunotransferencia con anti-LEDGF

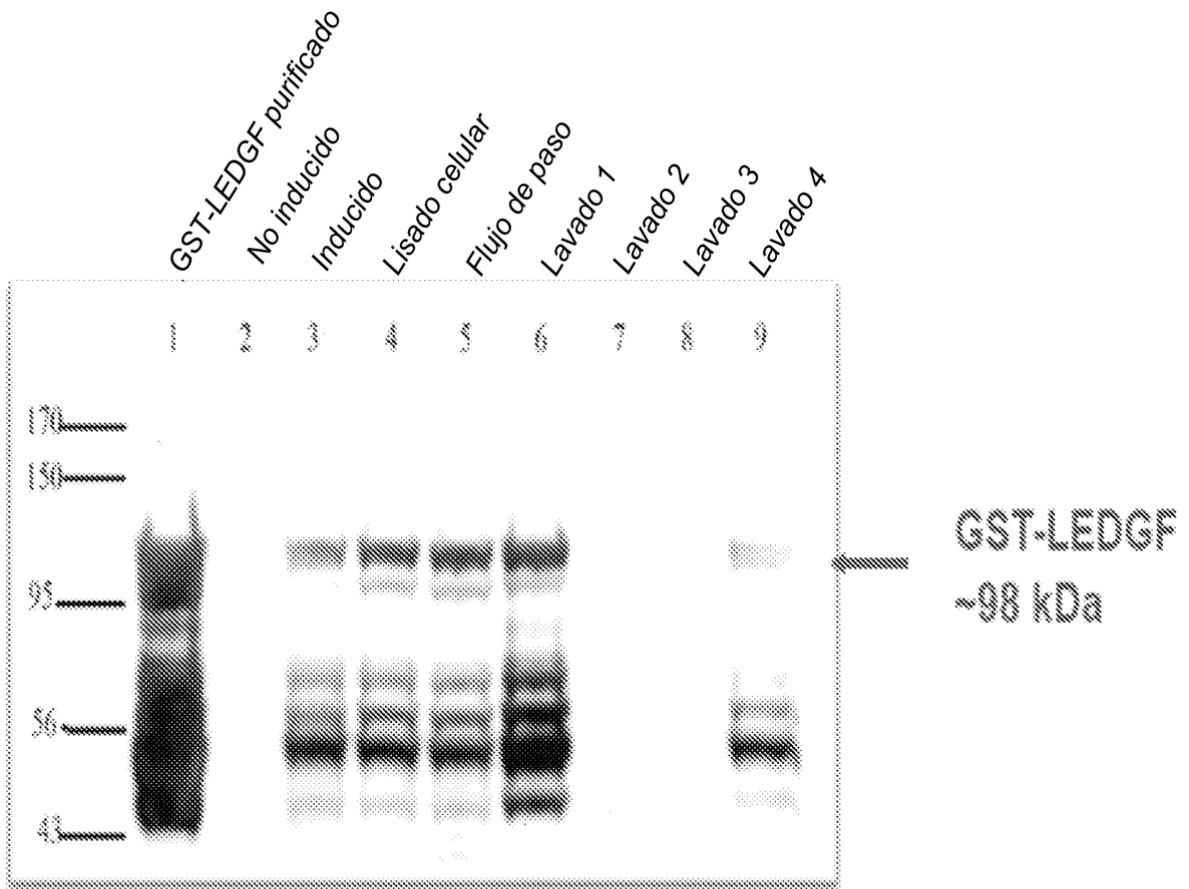
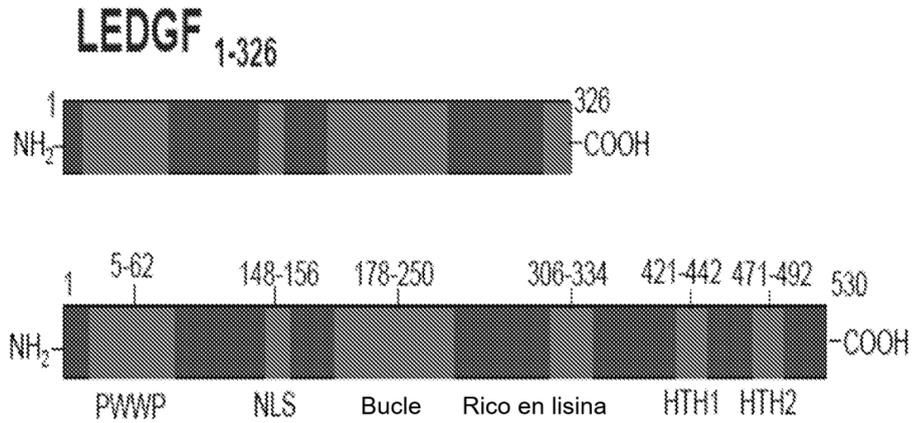


Figura 1

LEDGF₁₋₃₂₆ (Un nuevo fragmento de LEDGF)



LEDGF (factor de crecimiento derivado de epitelio del cristalino)

Figura 2

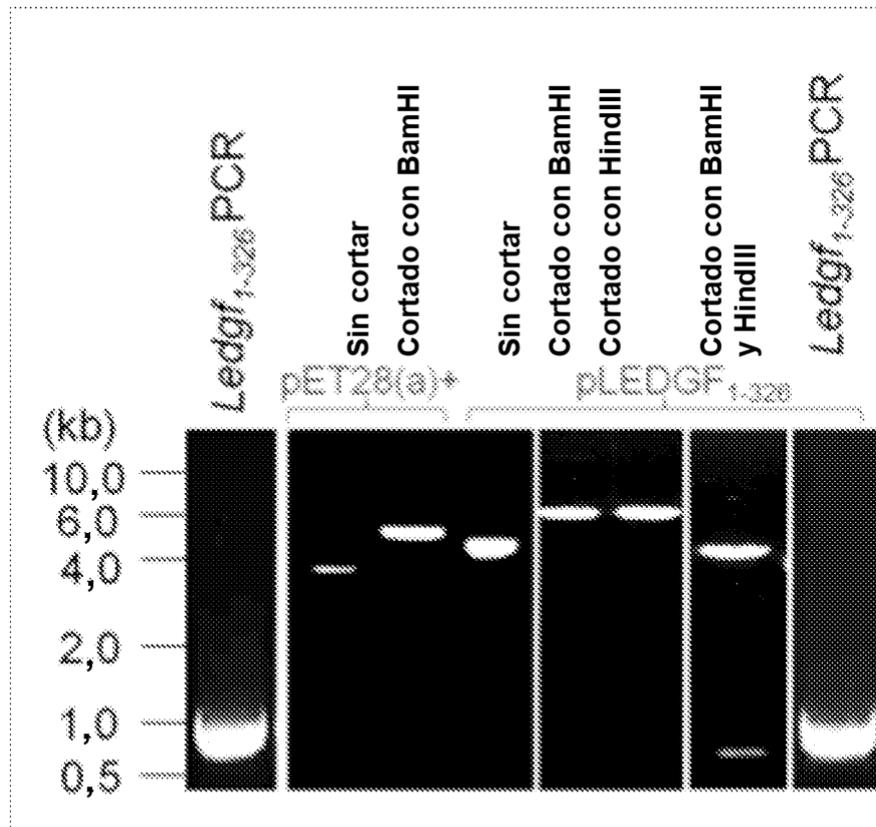


Figura 3

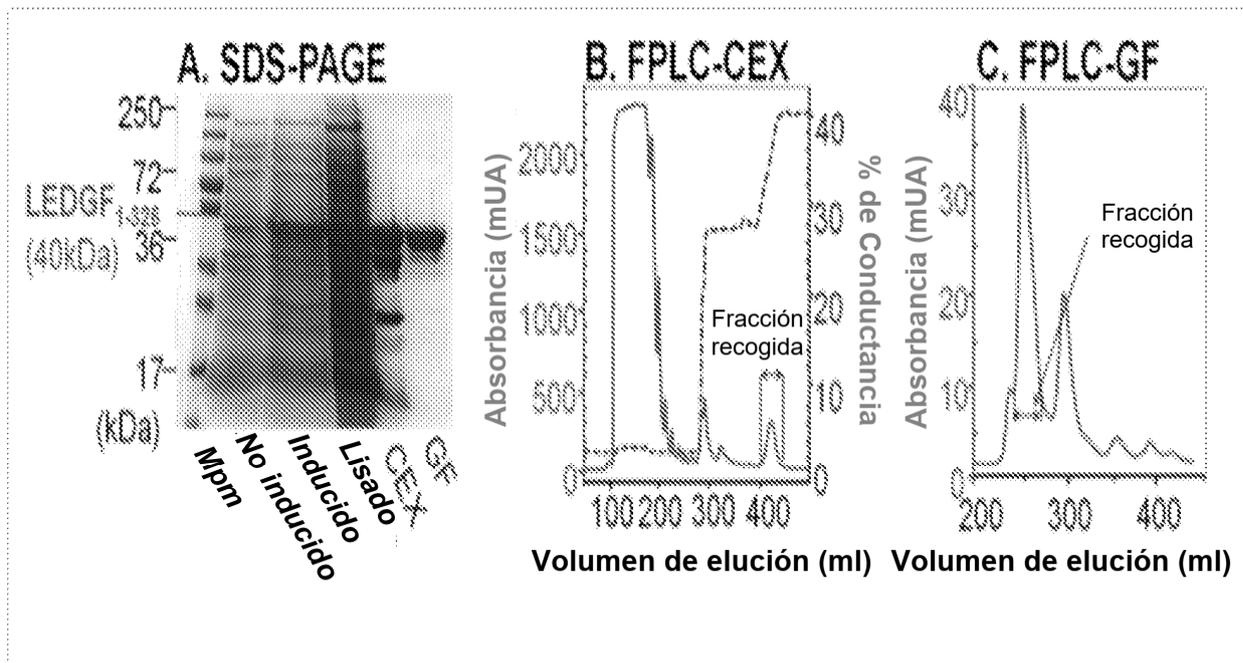


Figura 4

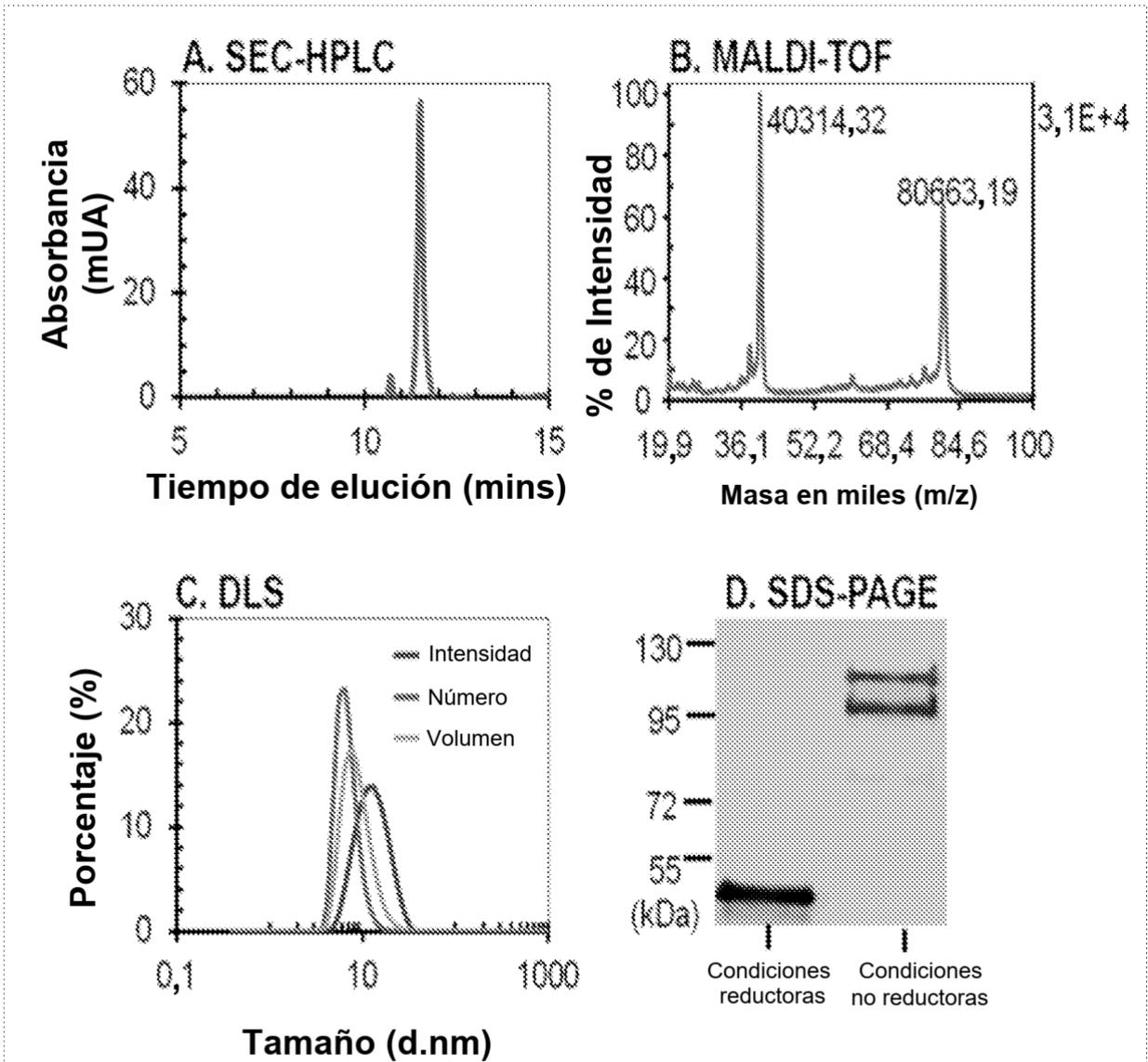


Figura 5

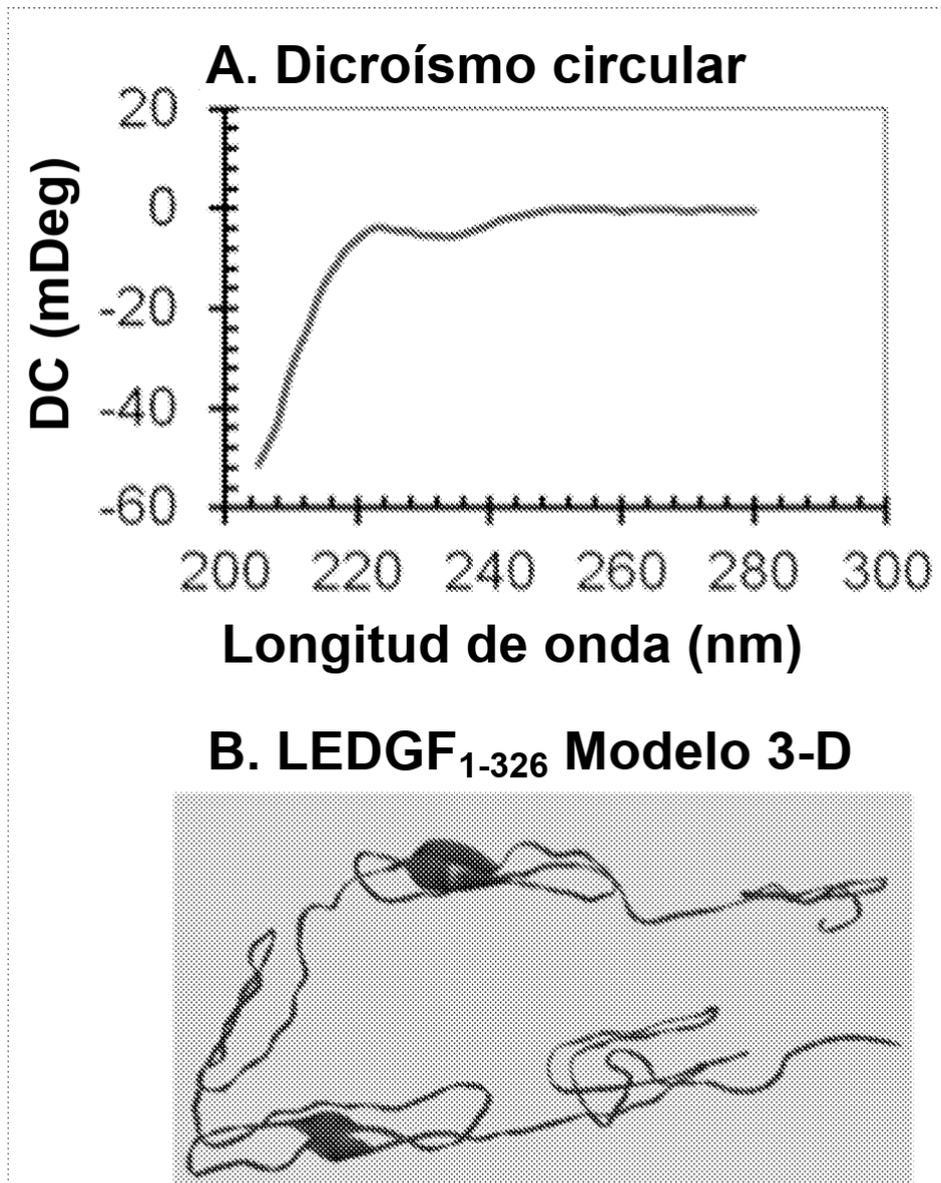


Figura 6

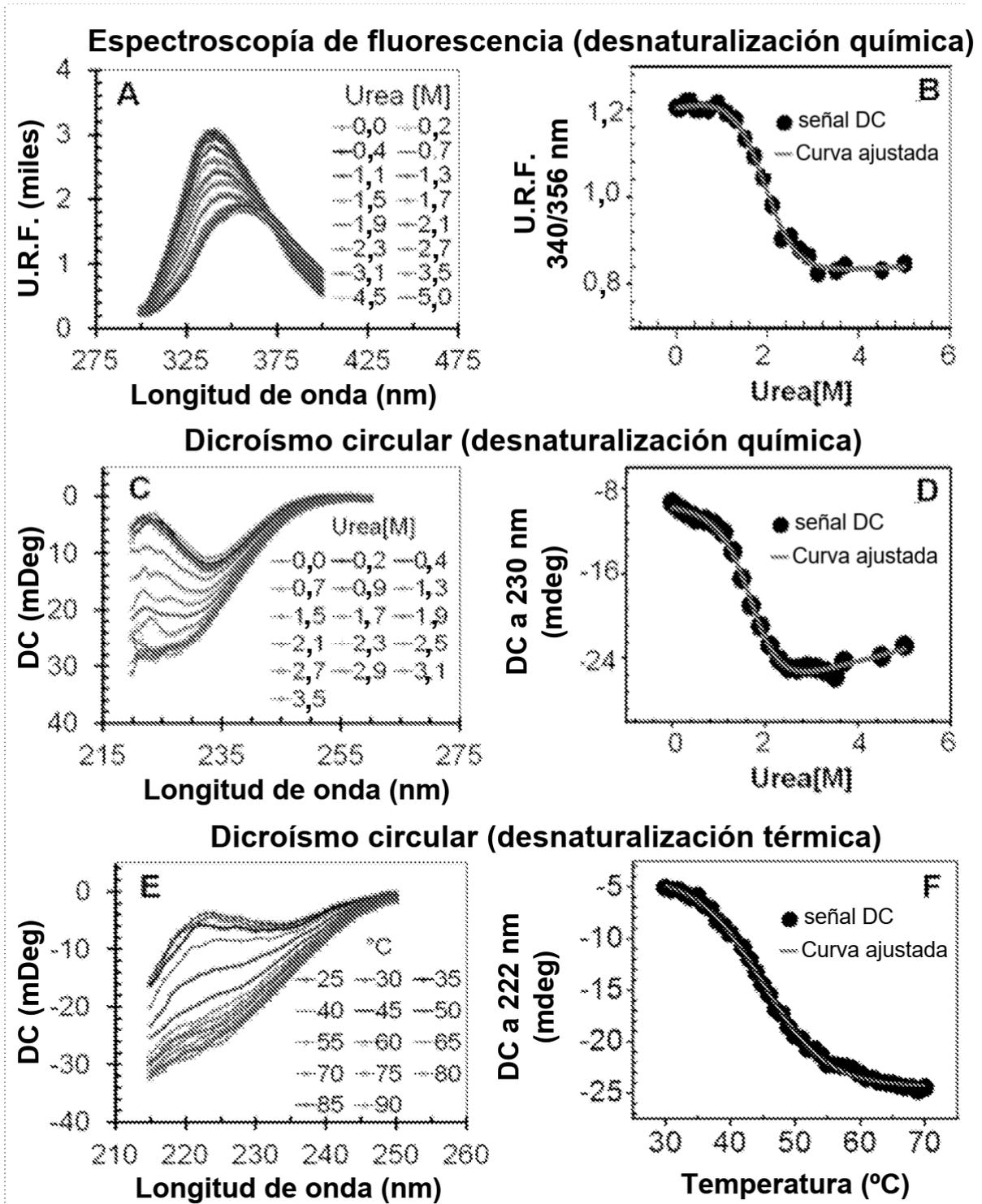


Figura 7

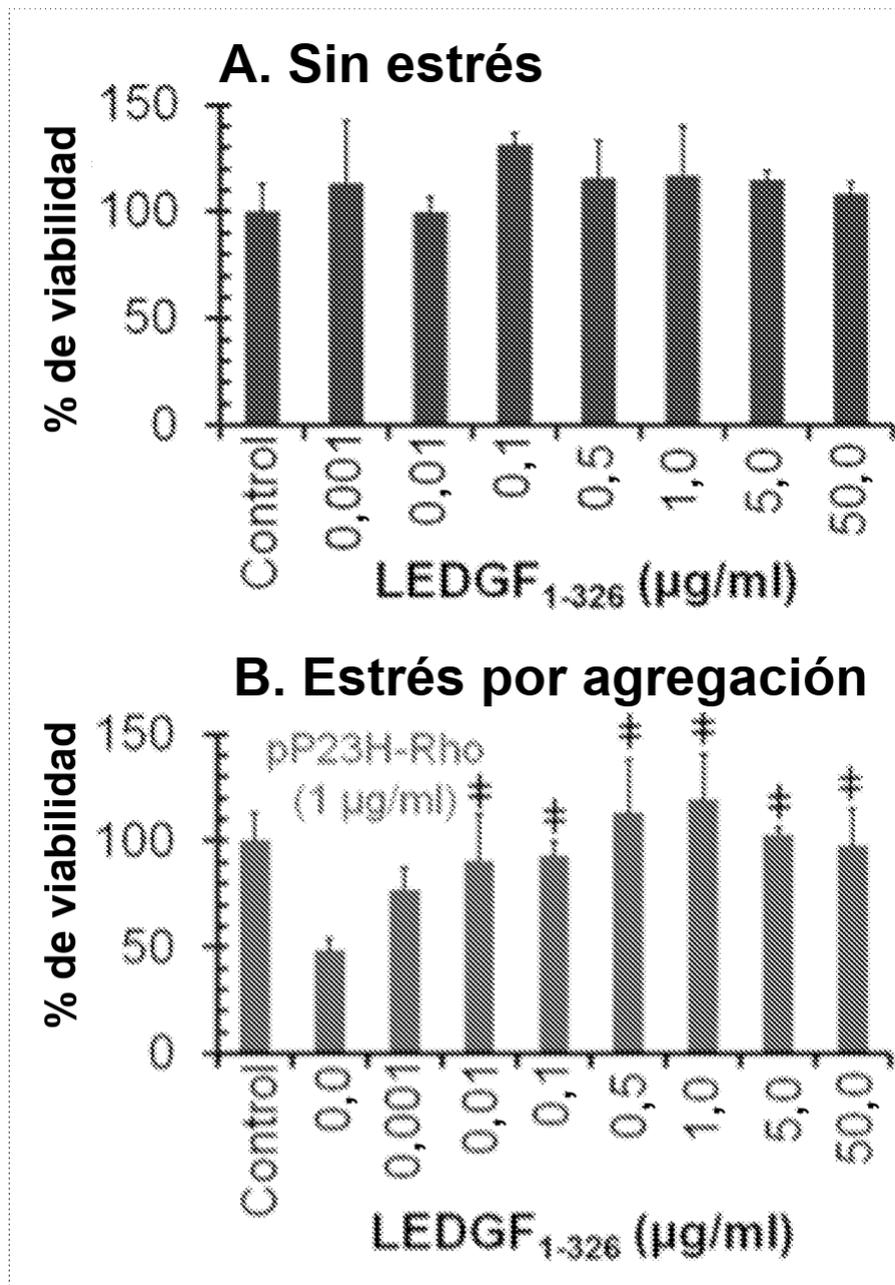


Figura 8

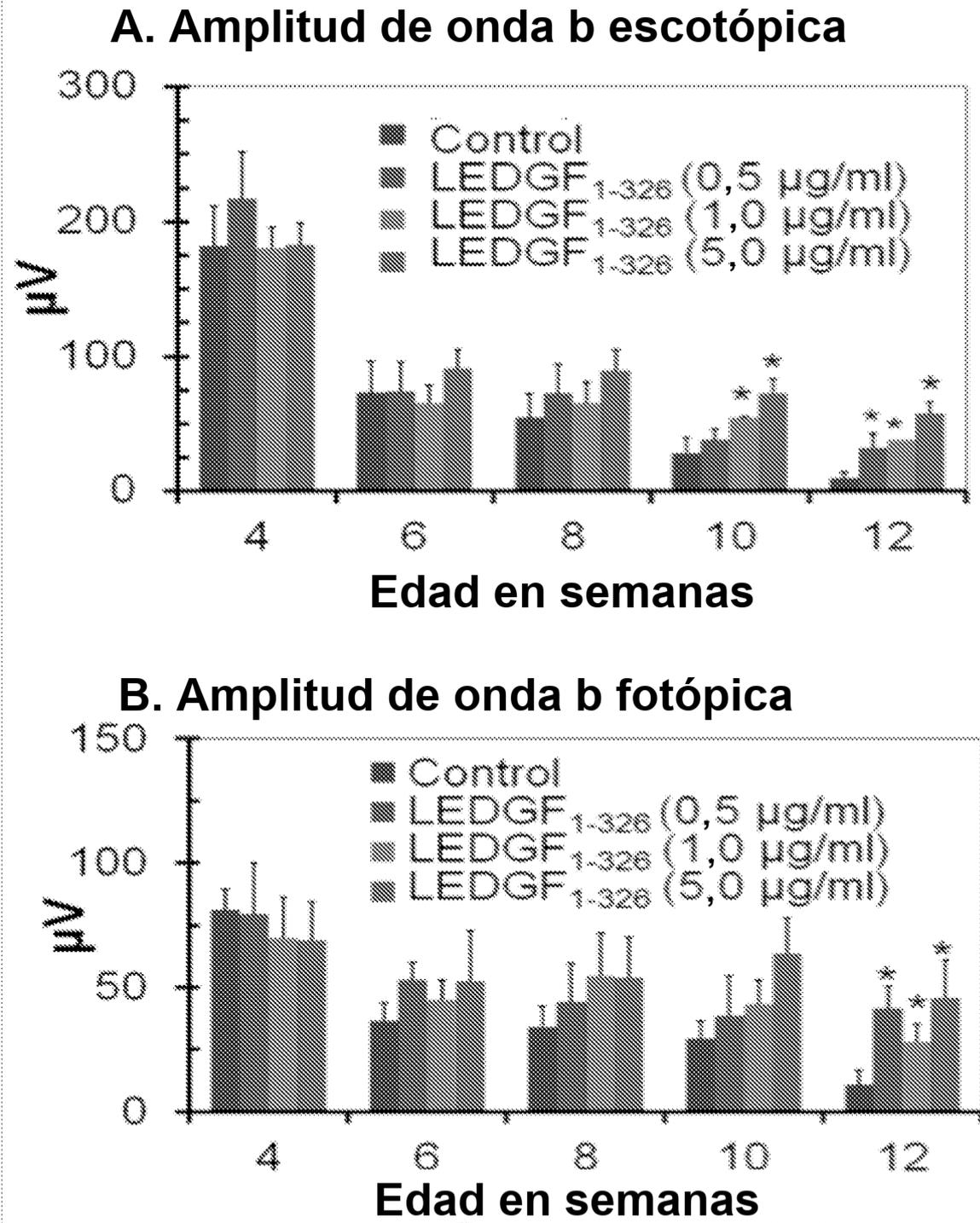


Figura 9

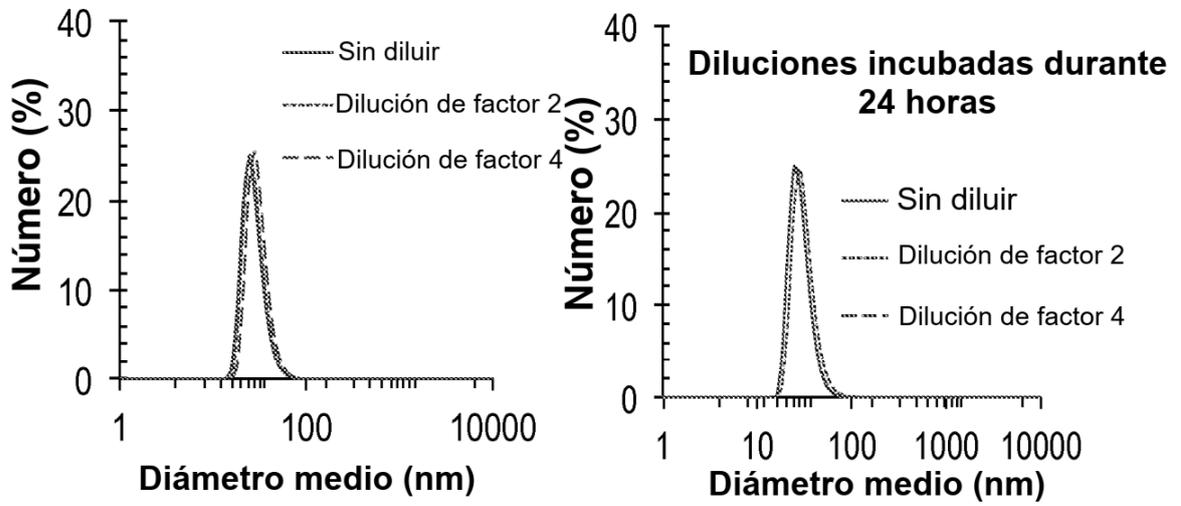


Figura 10

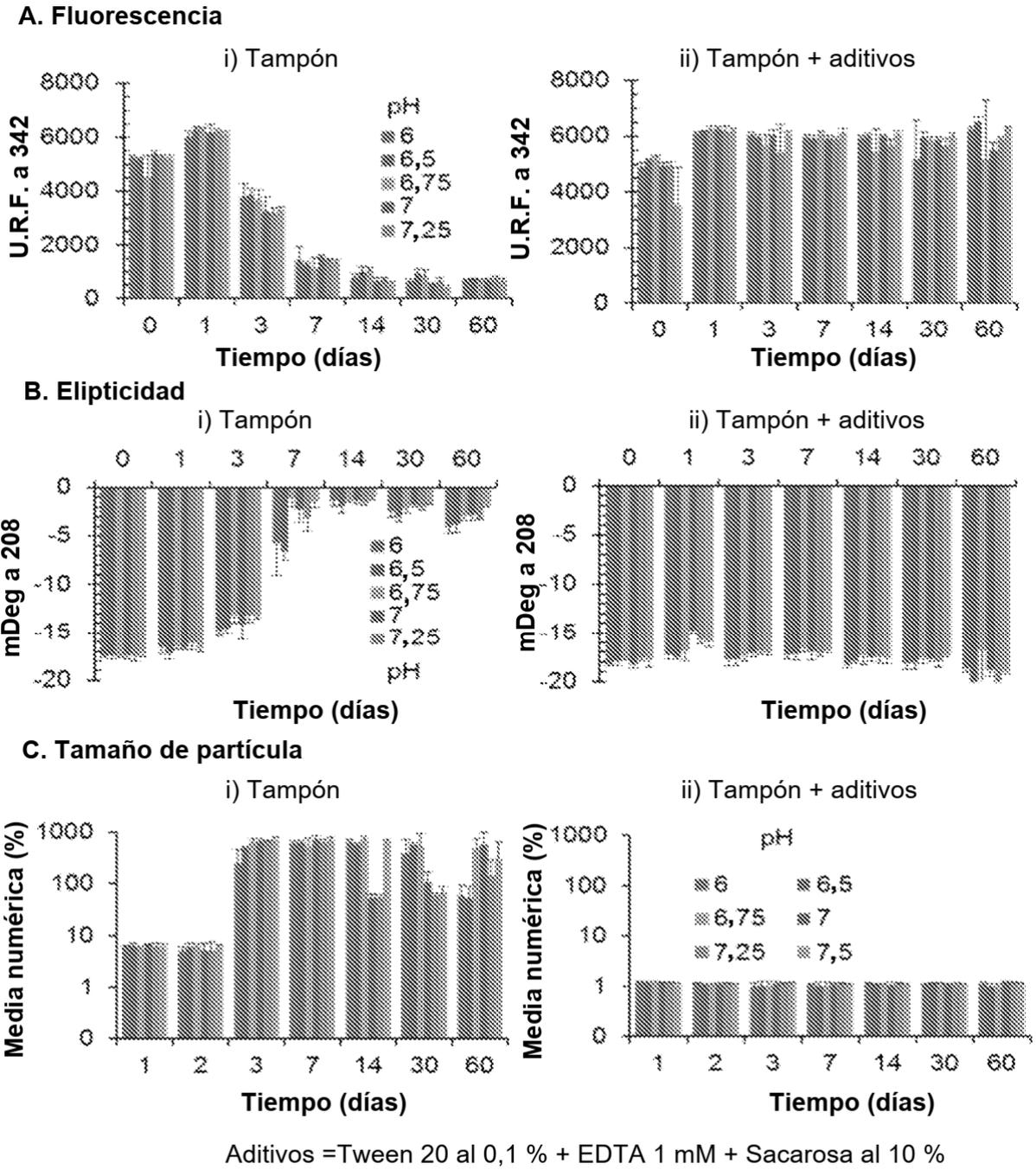


Figura 11

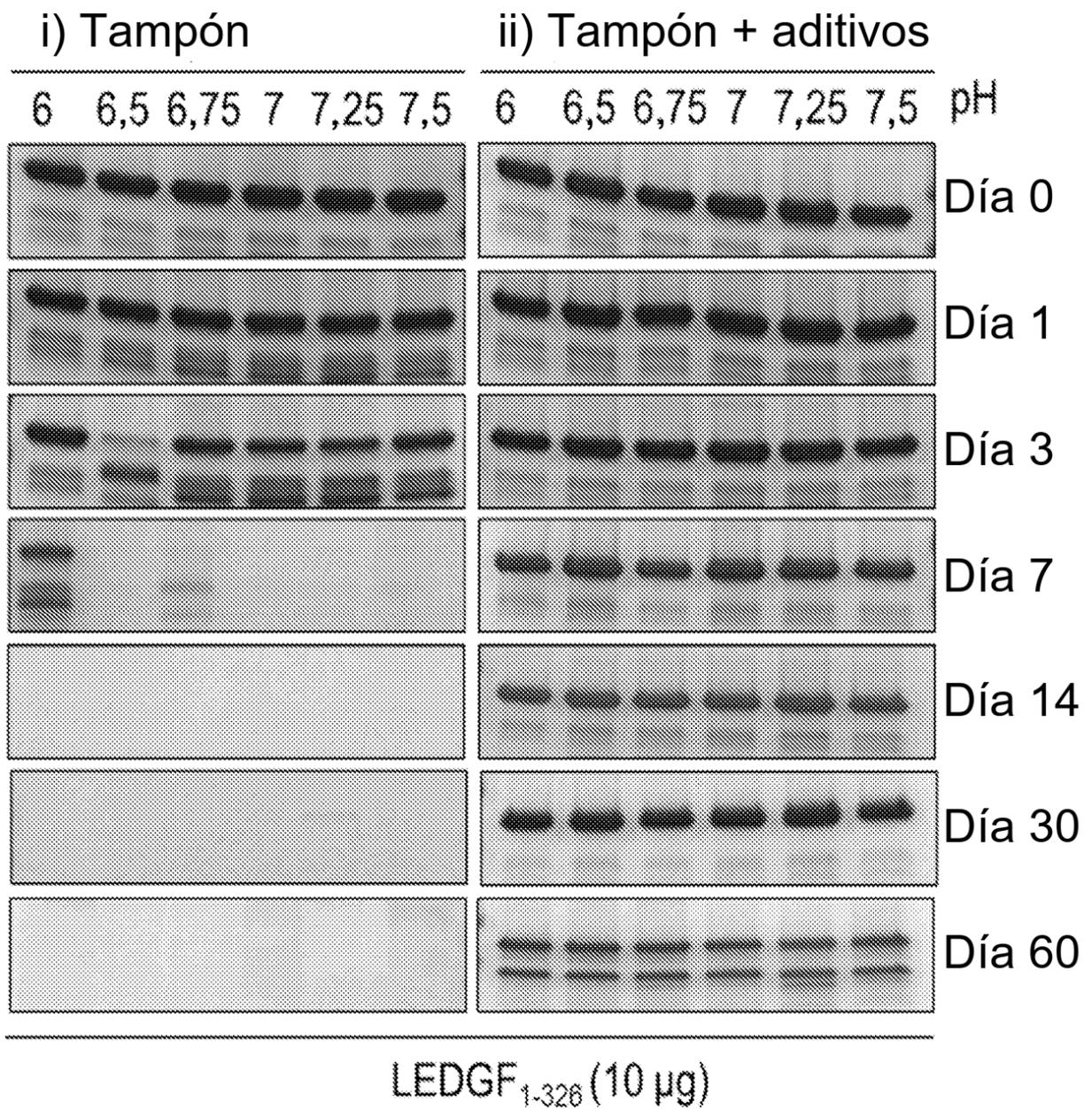
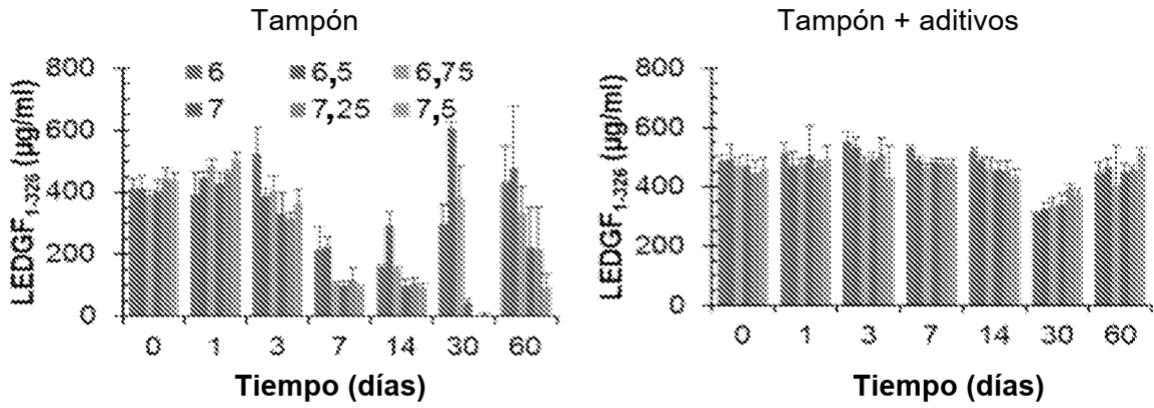
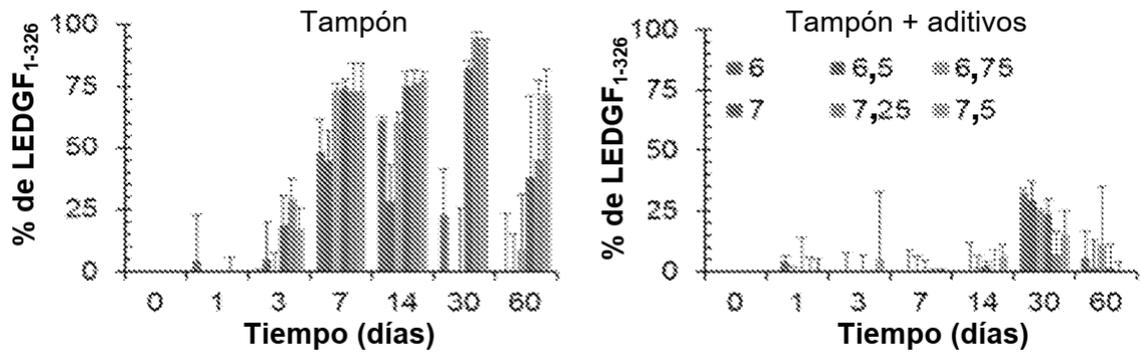


Figura 12

A. Proteína soluble



B. Agregados insolubles



C. Agregados visibles

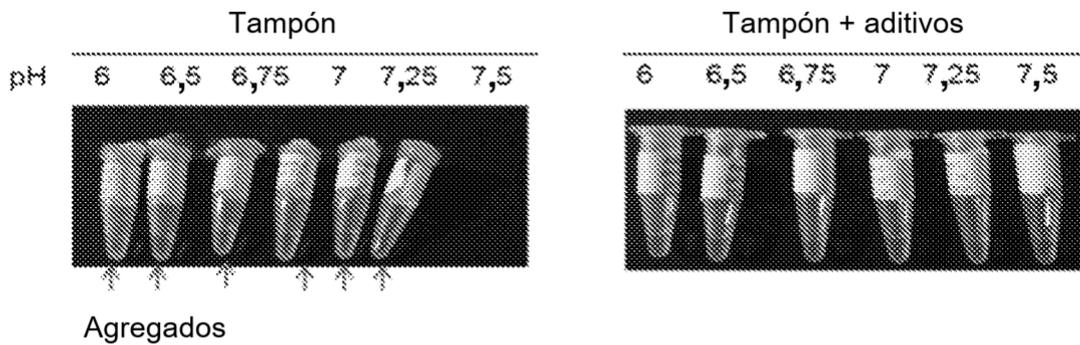


Figura 13

ELISA

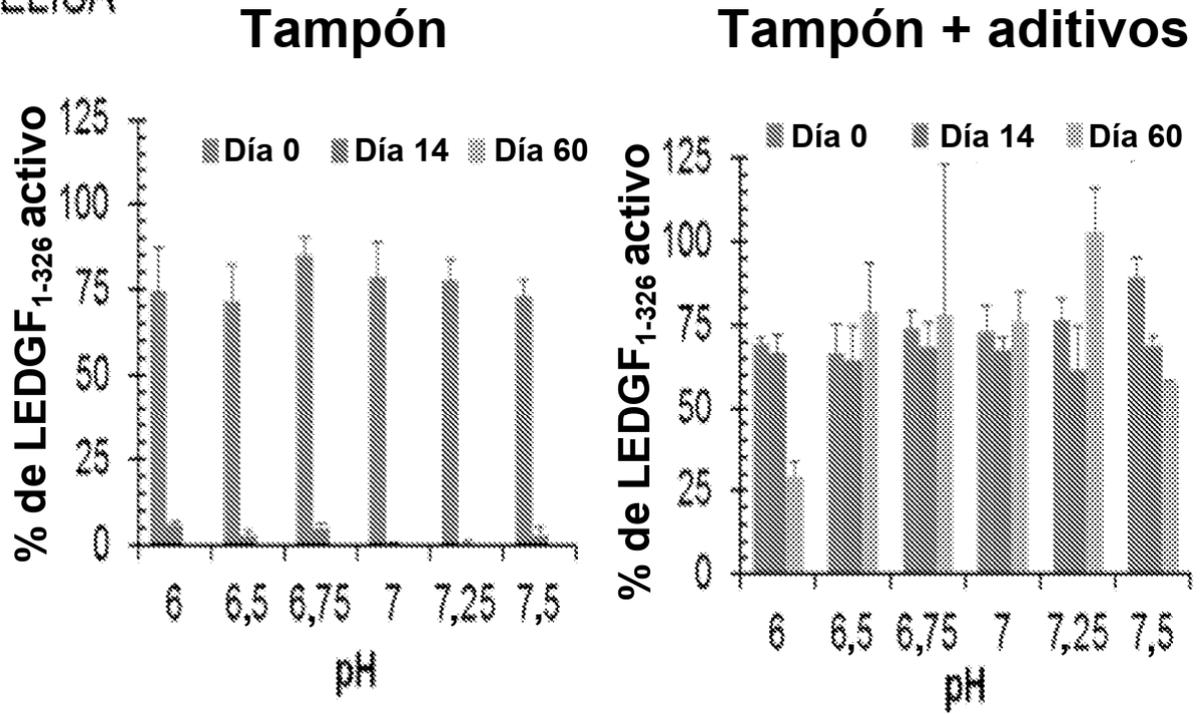
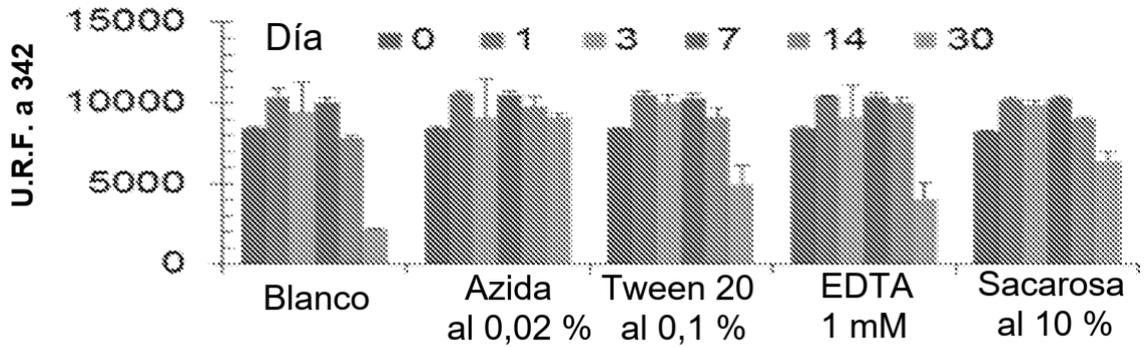
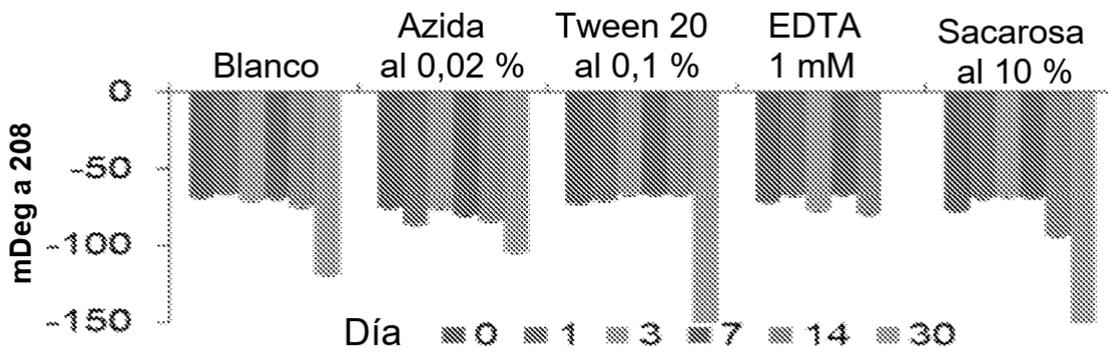


Figura 14

A. Fluorescencia



B. Elipticidad



C. Tamaño de partícula

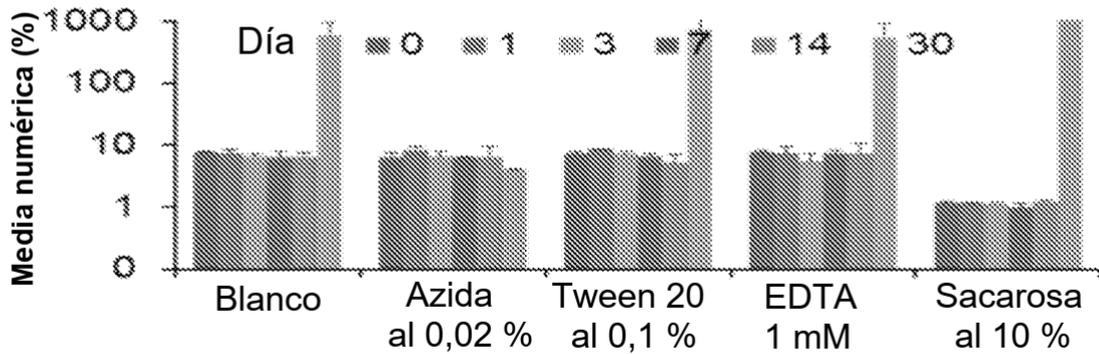


Figura 15

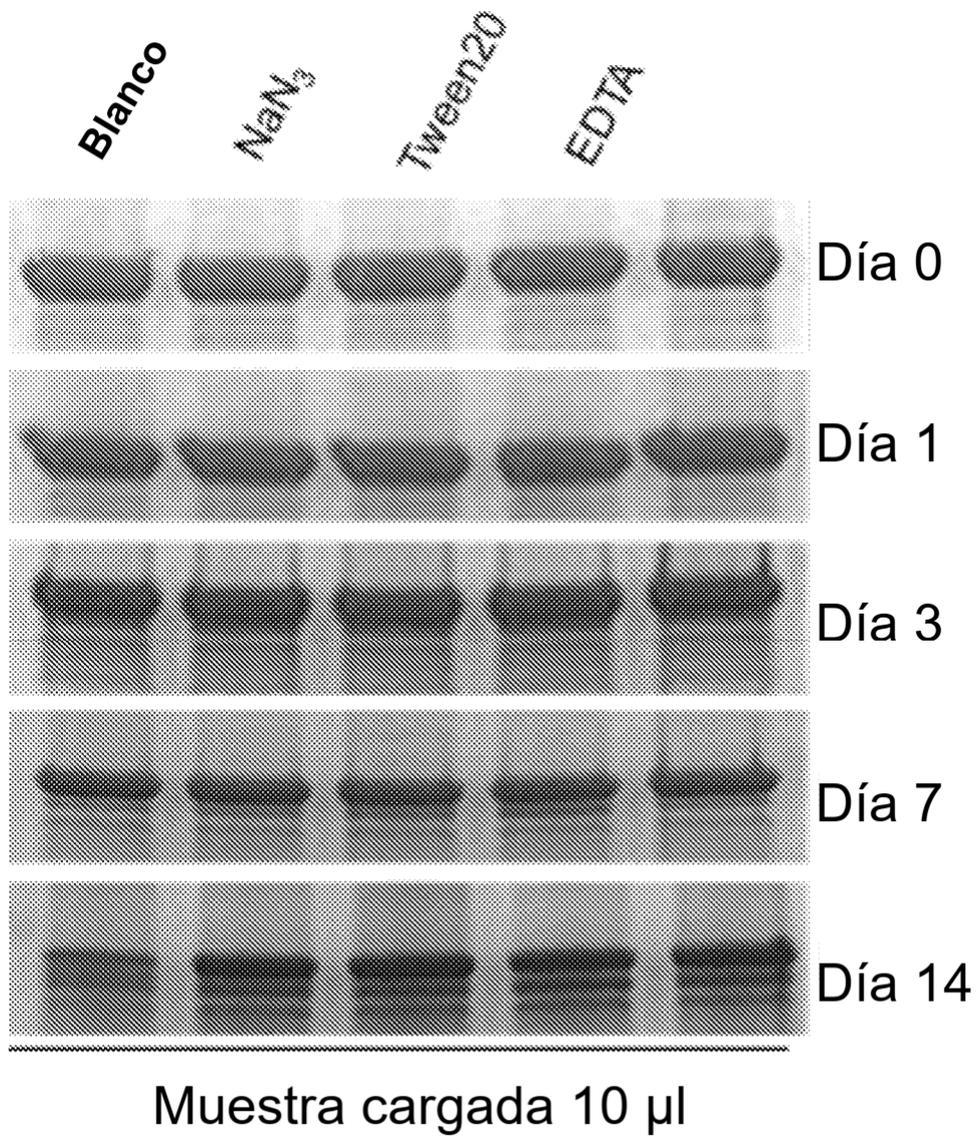


Figura 16

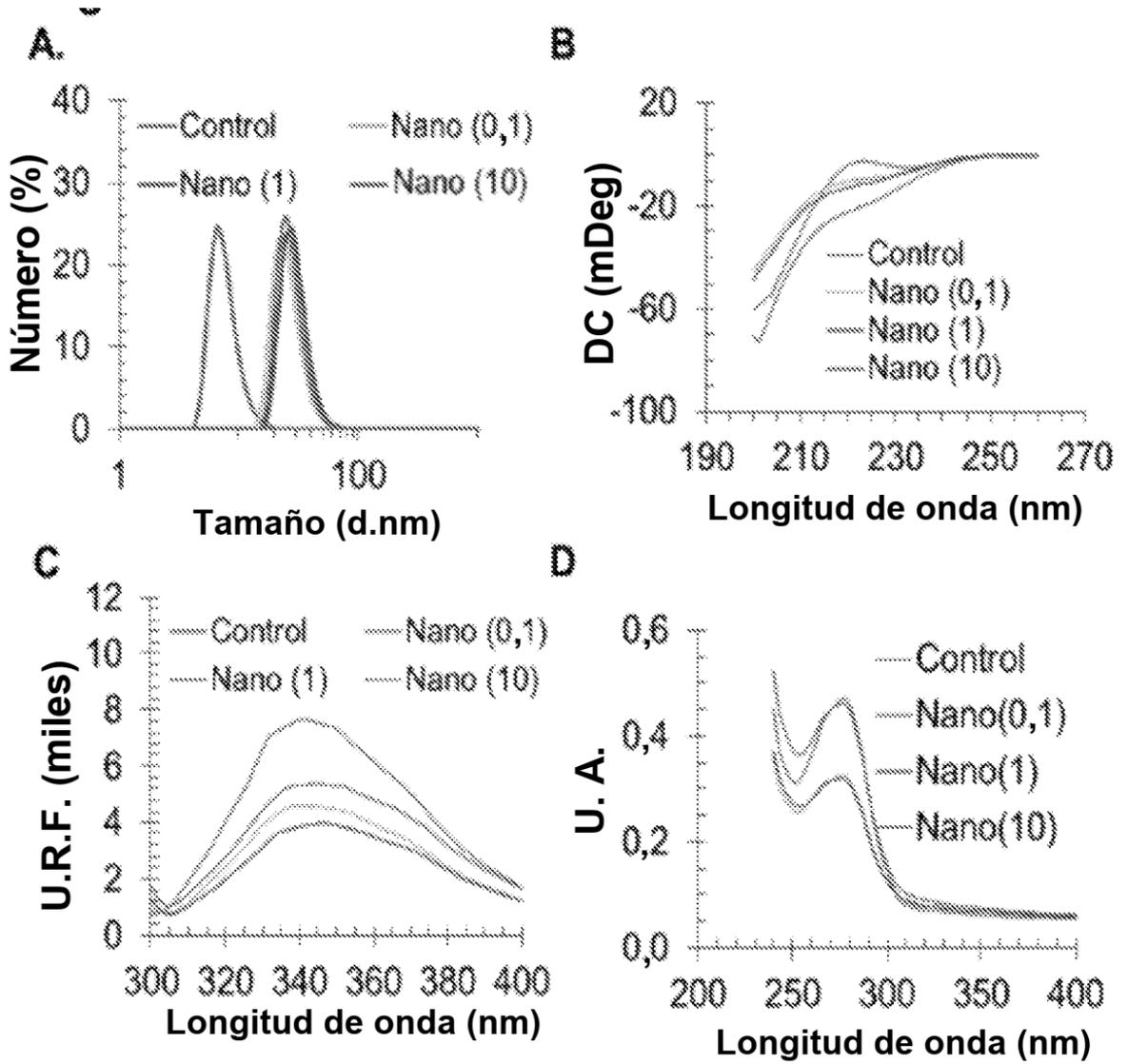


Figura 17

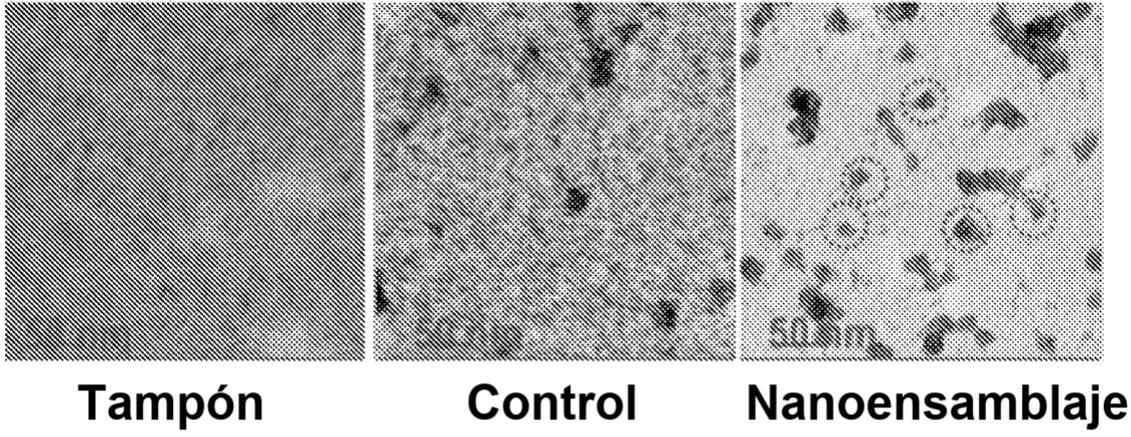


Figura 18

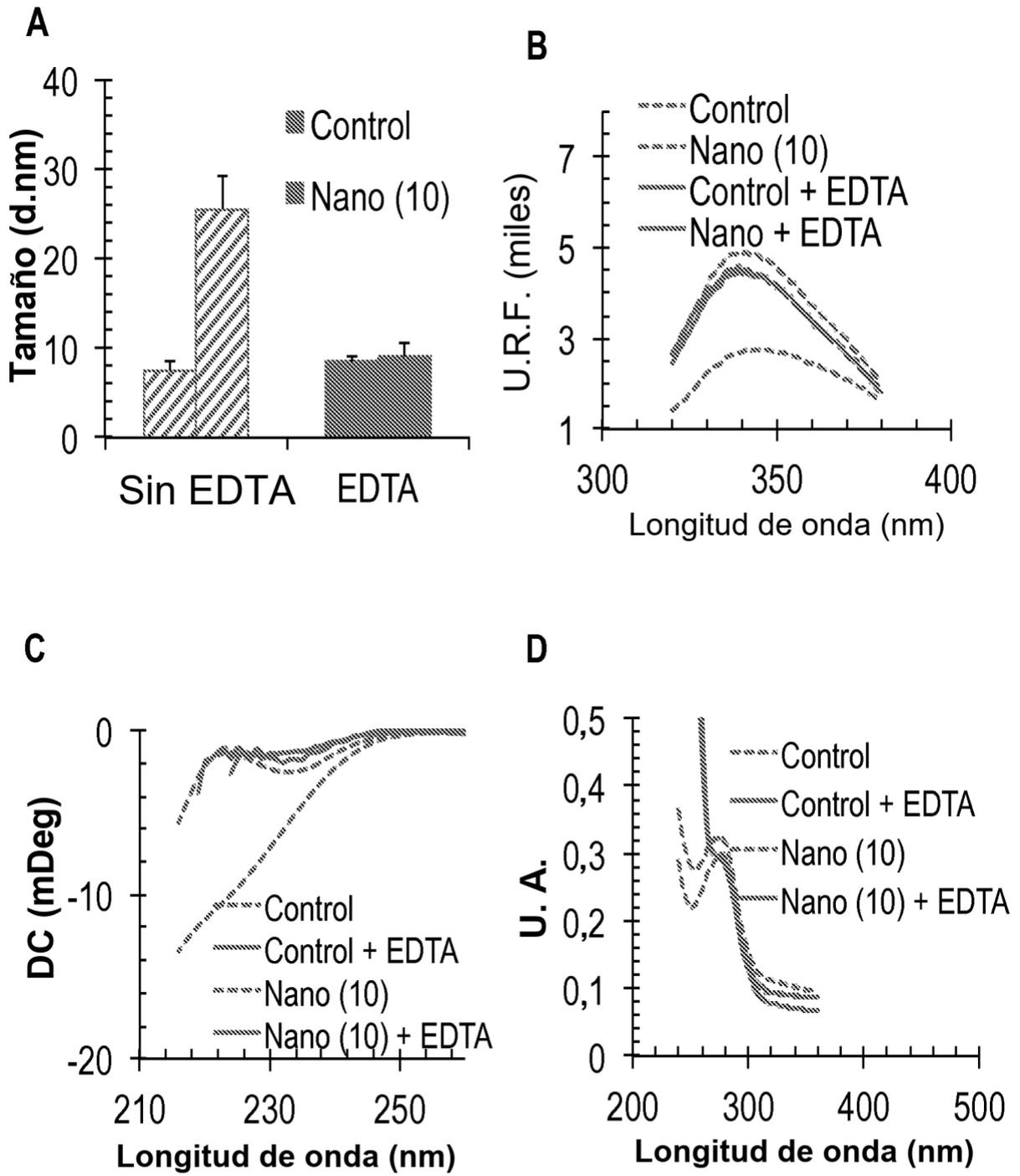


Figura 19

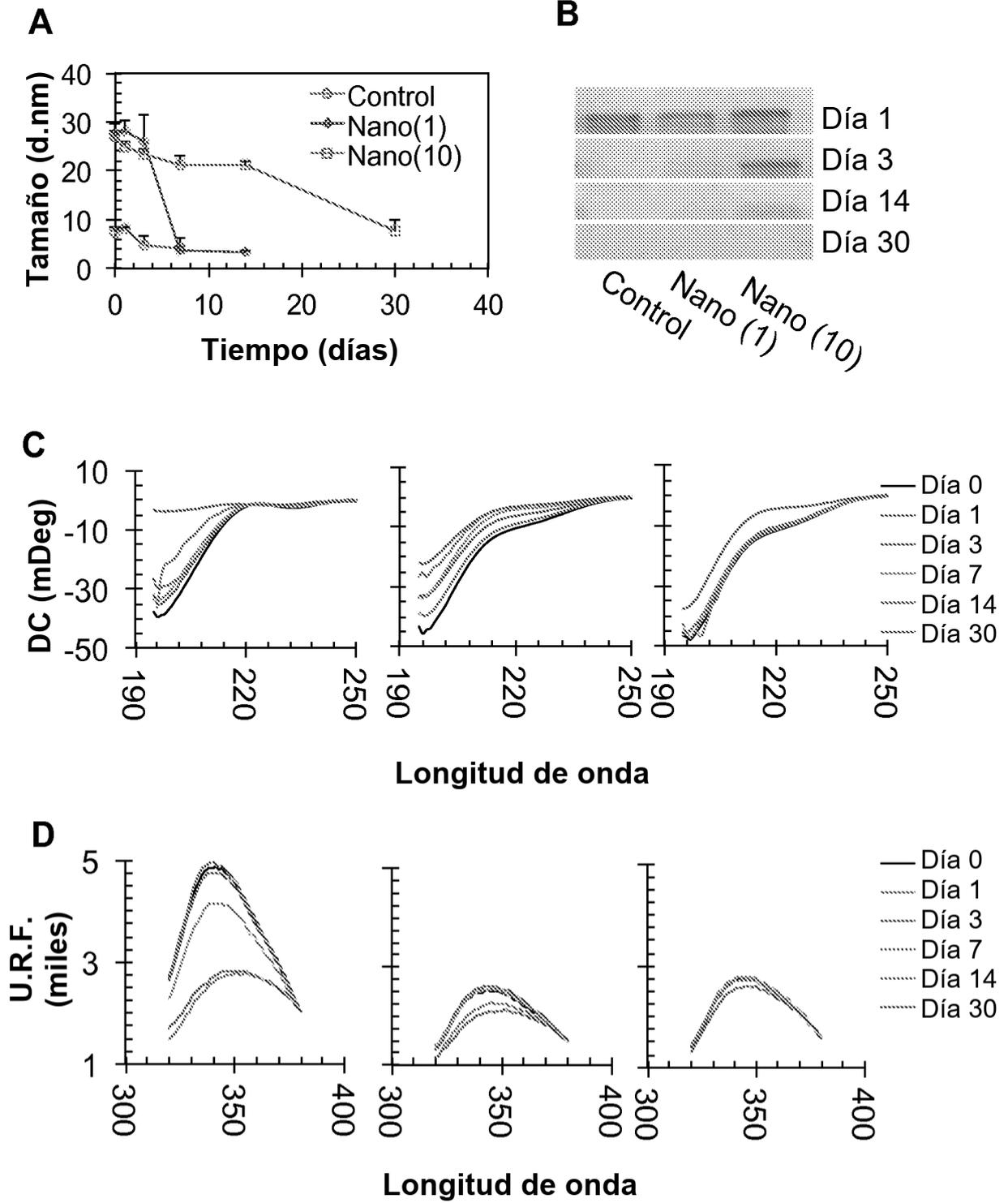


Figura 20

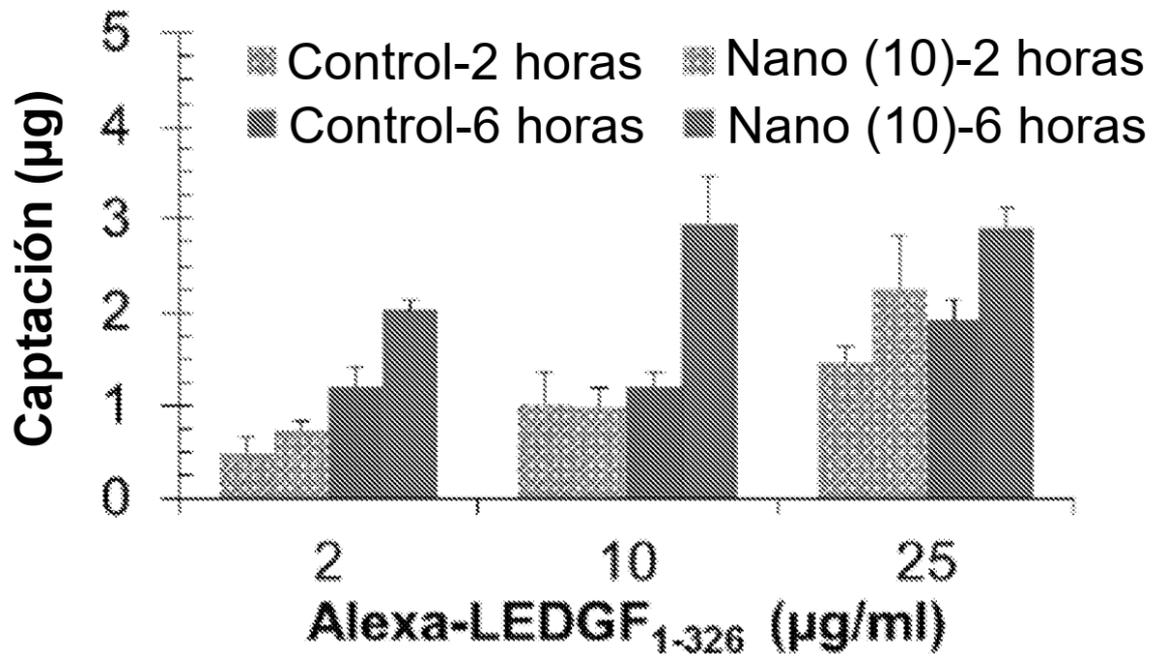


Figura 21

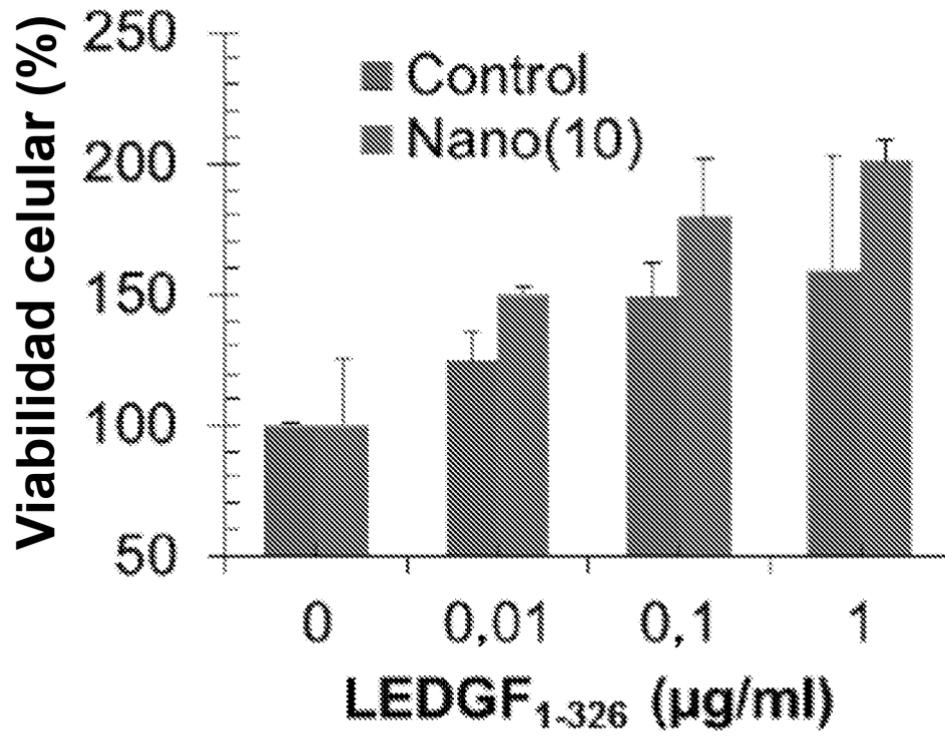


Figura 22

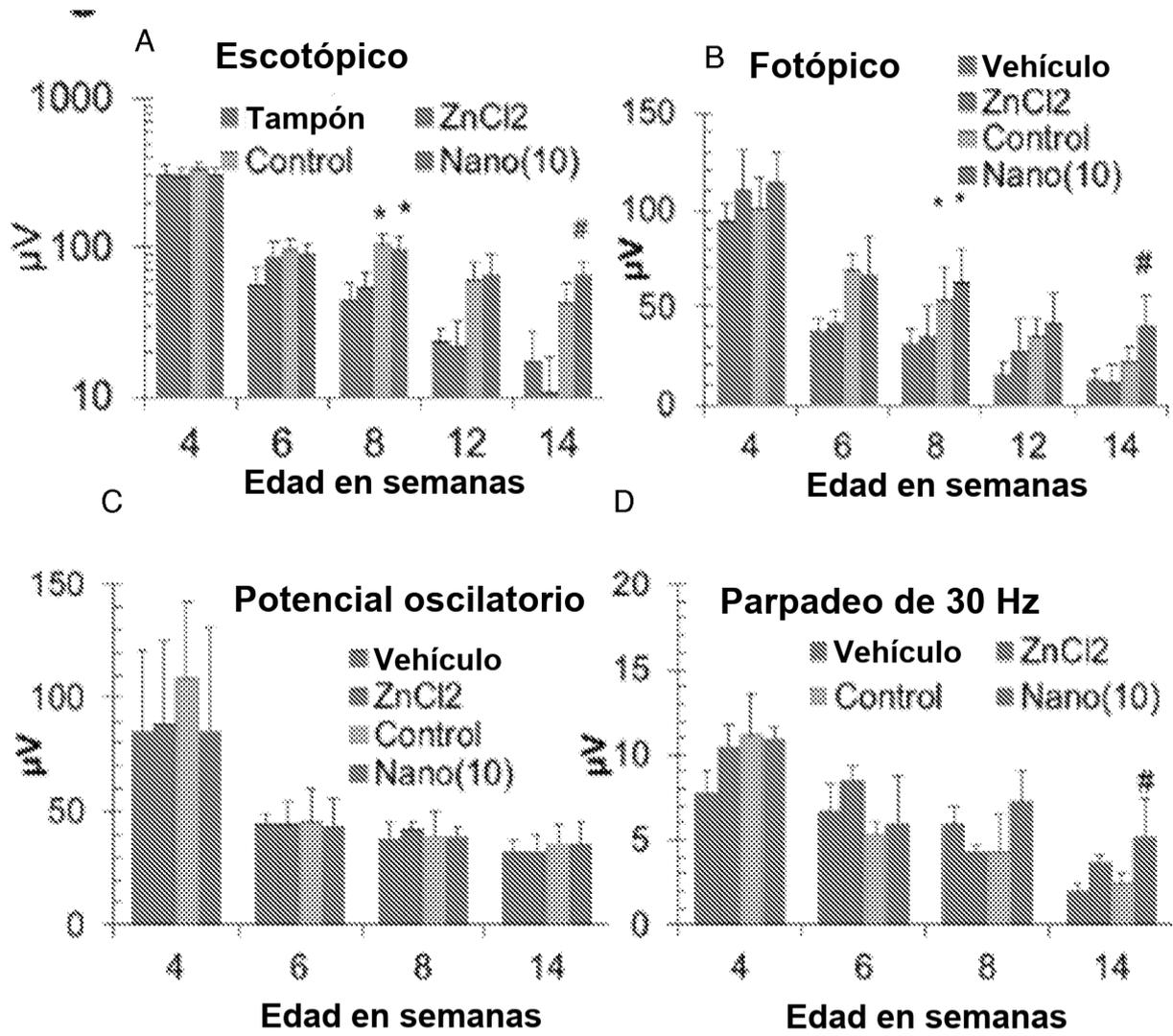


Figura 23

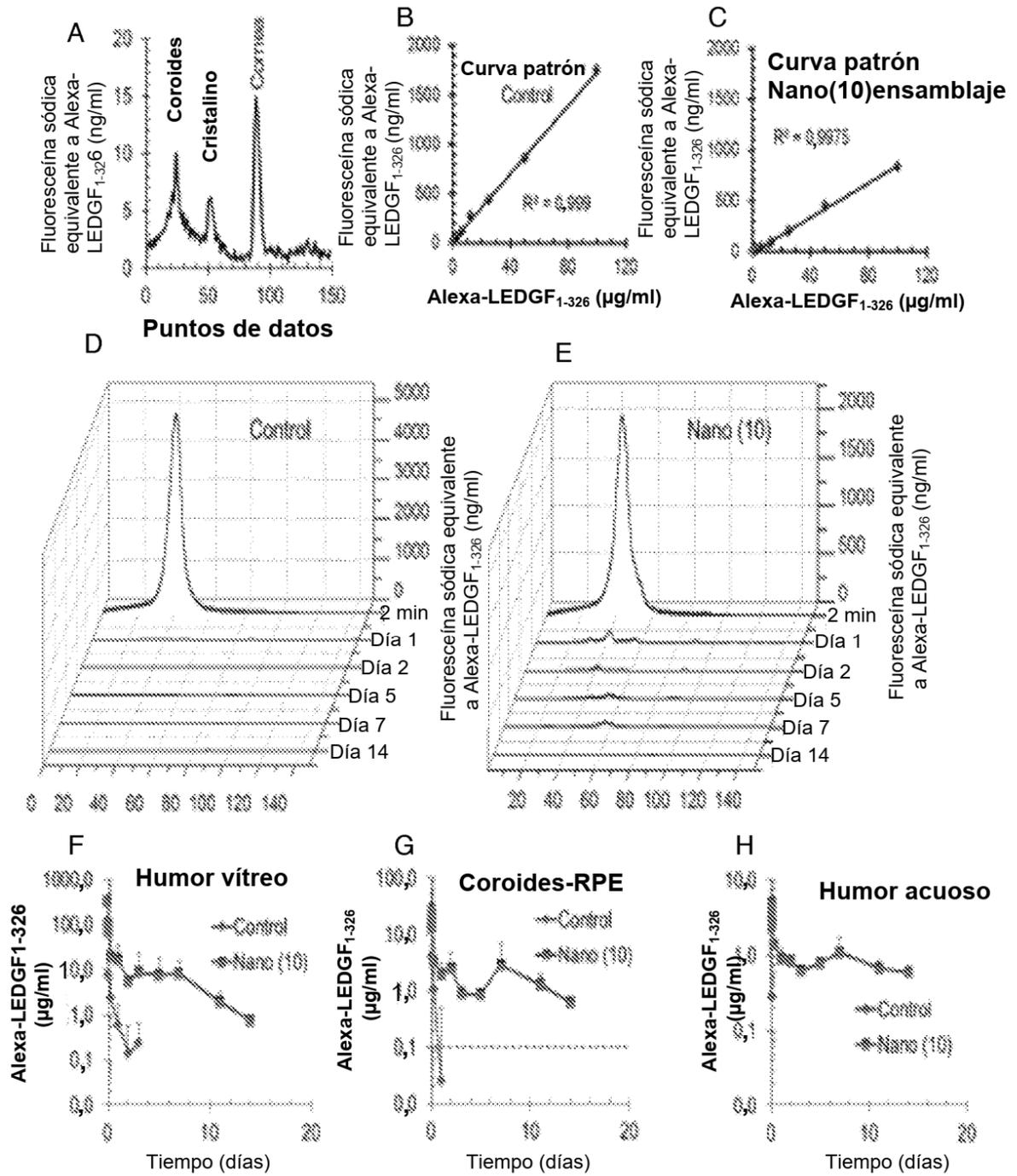


Figura 24

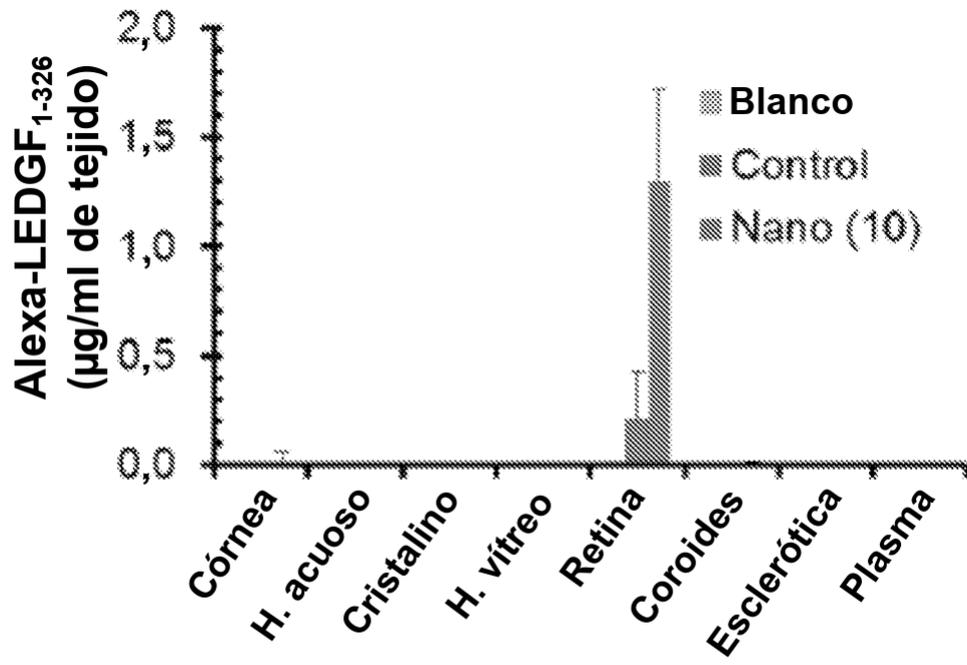


Figura 25

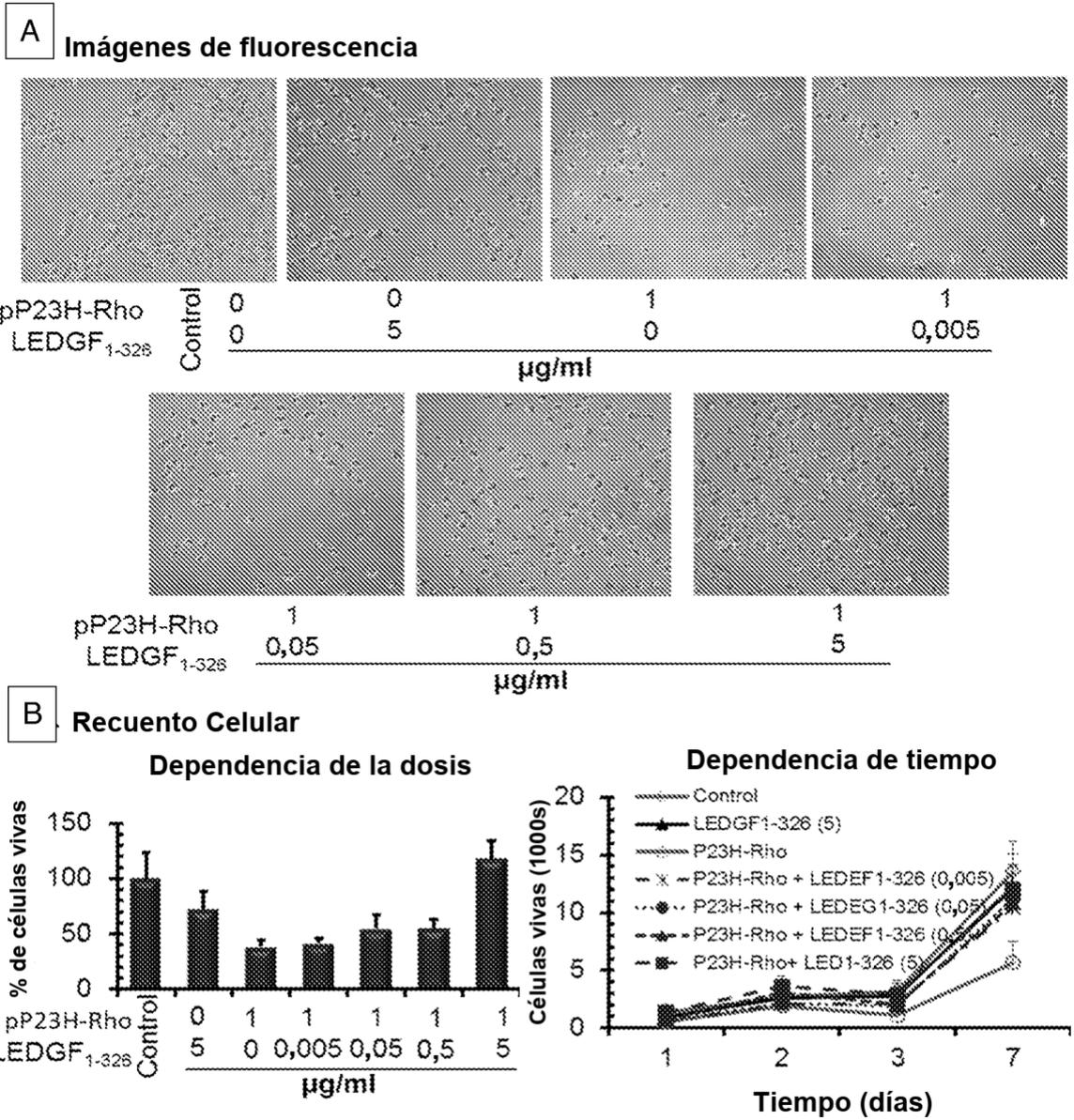


Figura 26

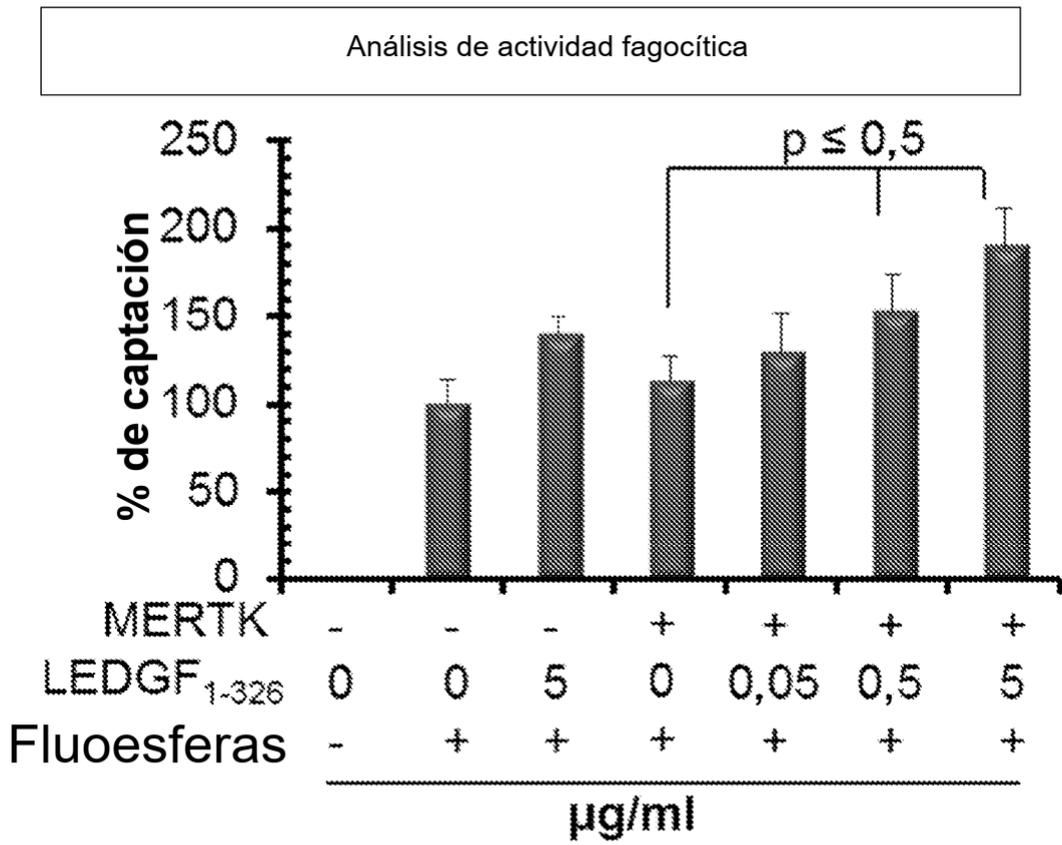


Figura 27

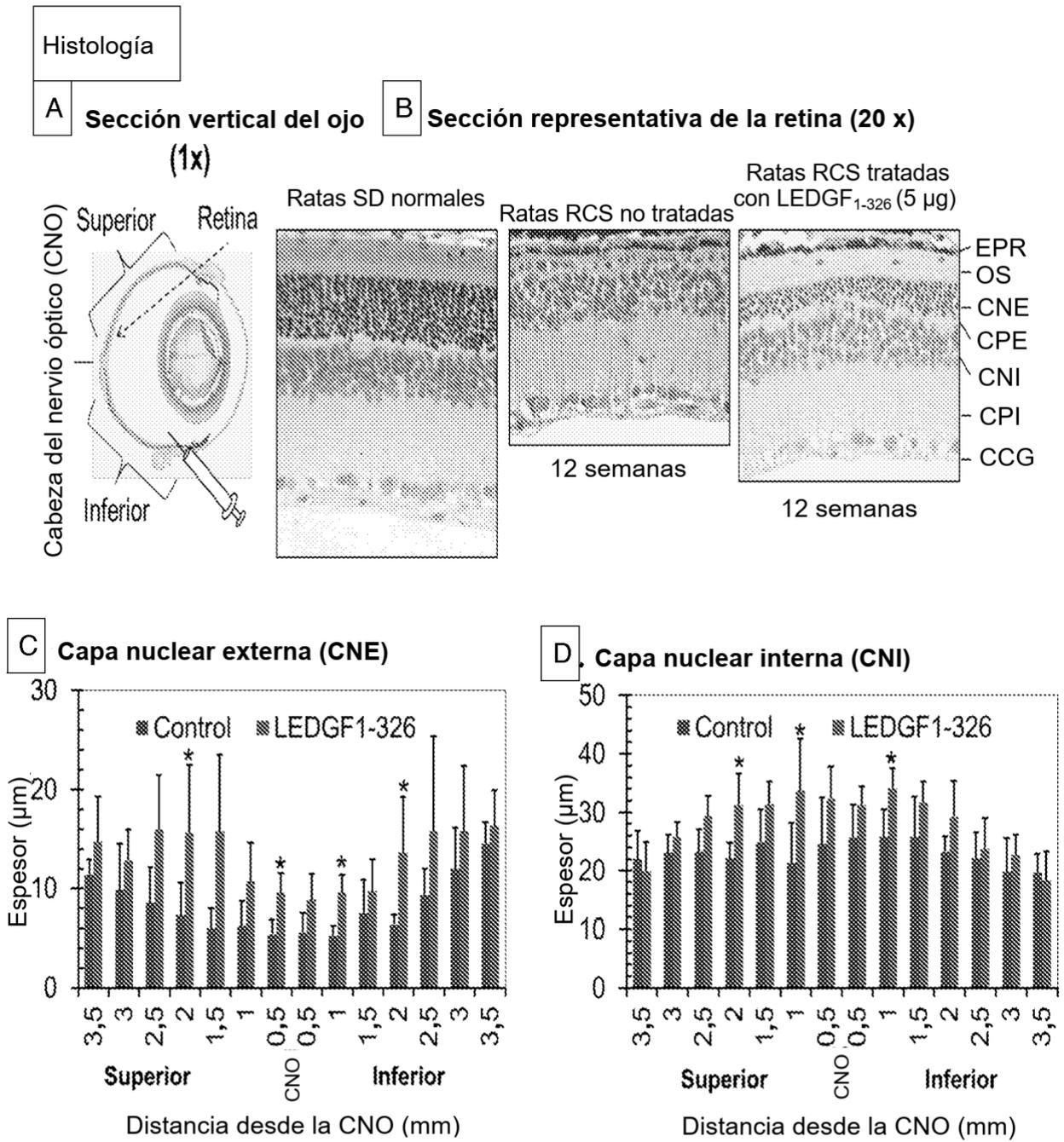


Figura 28

Inmunofluorescencia

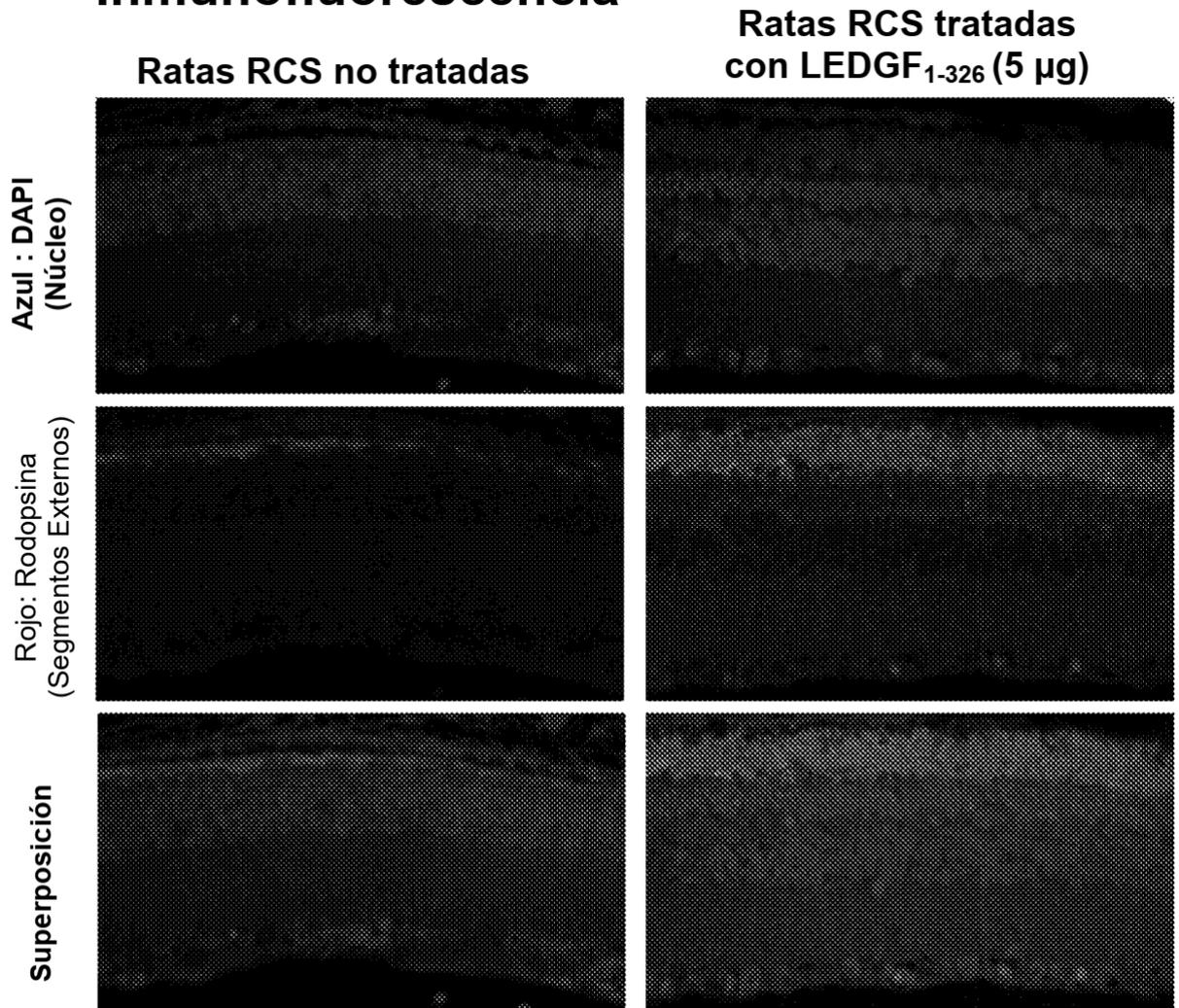


Figura 29

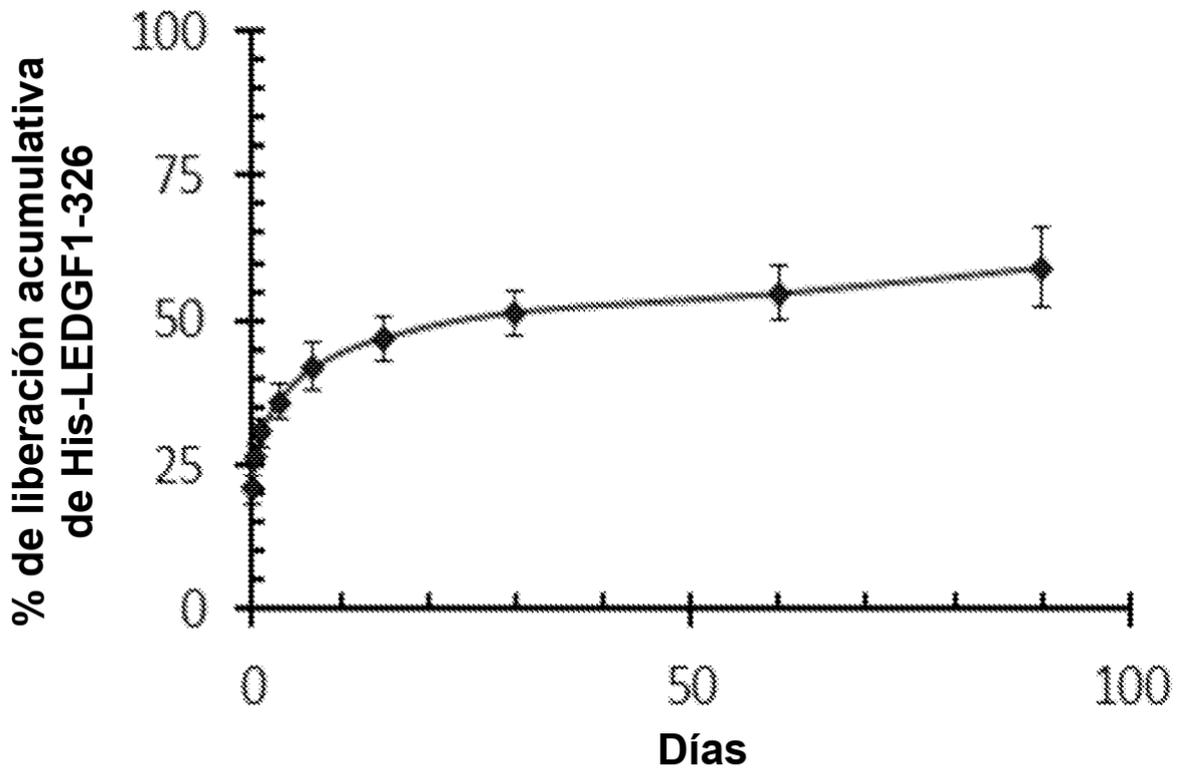


Figura 30

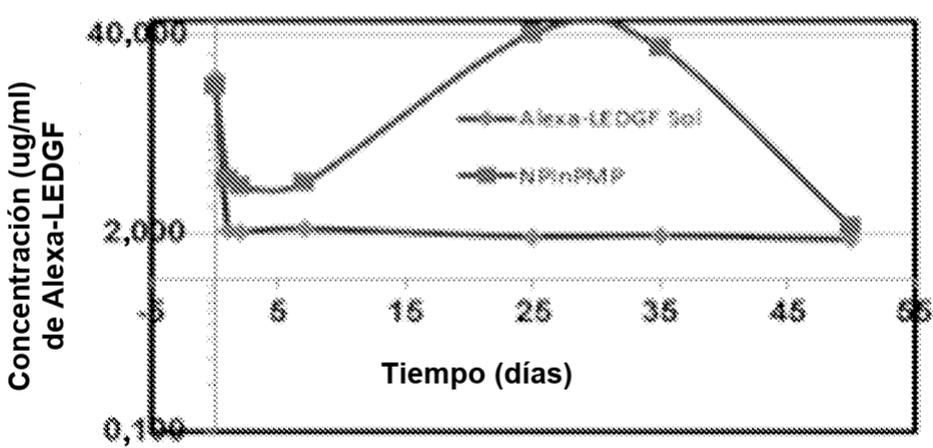
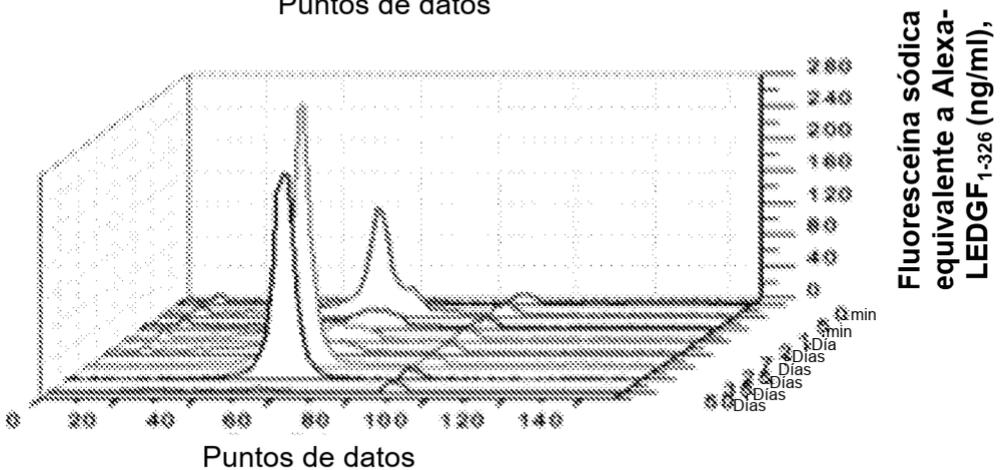
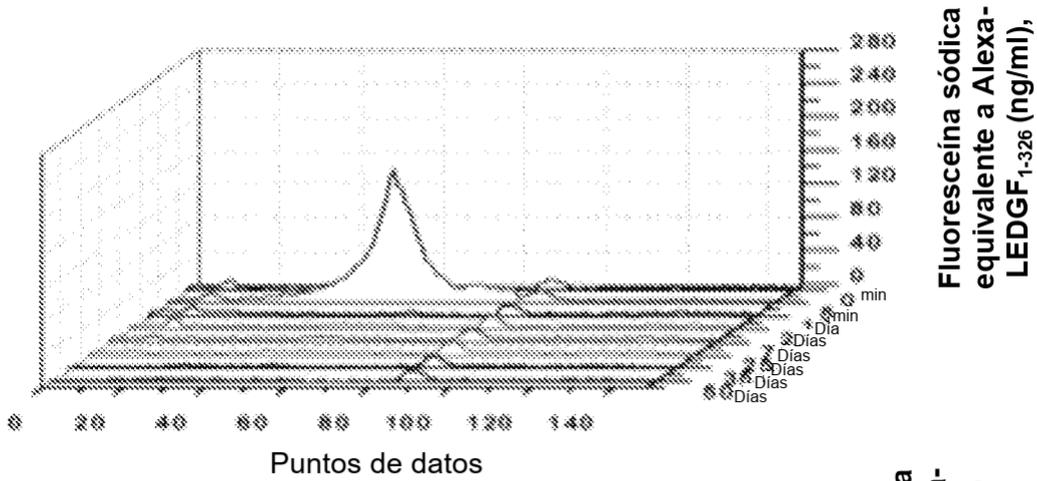


Figura 31

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del gran cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 61649847 B [0148]

10

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- JAGER et al. *N ENGL J MED*, 2008, vol. 358 (24), 2606-17 [0002]
- FRIEDMAN et al. *Arch Ophthalmol*, 2004, vol. 122 (4), 564-72 [0002]
- 15 • LIBBY et al. *Adv Exp Med Biol*, 2010, vol. 664, 403-9 [0002]
- STUEN. *Generations*, 2003, vol. 27, 8-14 [0002]
- OHGURO, H. et al. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi*, 2002, vol. 106 (8), 461-73 [0002]
- DRYJA et al. *Nature*, 1990, vol. 343 (6256), 364-6 [0002]
- HARTONG et al. *Lancet*, 2006, vol. 368 (9549), 1795-809 [0002]
- 20 • KOMPELLA et al. *Ther Deliv.*, vol. 1 (3), 435-56 [0003]
- GAUDANA, R. et al. Ocular drug delivery. *Aaps J*, 2010, vol. 12 (3), 348-60 [0003]
- THRIMAWITHANA et al. *Drug Discov Today*, 2011, vol. 16 (5-6), 270-7 [0003]
- BAID et al. Drug Development and the back of the eye. 2010, 409-448 [0003]
- PEYMAN et al. *Retina*, 2009, vol. 29 (7), 875-912 [0003]
- 25 • WU et al. *Semin Ophthalmol*, 2009, vol. 24 (2), 100-5 [0003]
- RINKU BAID et al. LEDGF1-326 decreases P23H and wild-type rhodopsin aggregates and P23H rhodopsin mediated cell damage in human retinal pigment epithelial cells. *PLOS ONE*, vol. 6 (9), 1-14 [0004]
- OGAWA Y et al. Autoantigenicity of DFS70 is restricted to the conformational epitope of C-terminal alpha-helical domain. *J. Autoimmunity*, vol. 23 (3), 221-231 [0005]
- 30 • SMITH ; WATERMAN. *Adv. Appl. Math.*, 1981, vol. 2, 482 [0015]
- NEEDLEMAN ; WUNSCH. *J. Mol. Biol.*, vol. 48, 443 [0015]
- PEARSON ; LIPMAN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 2444 [0015]
- HIGGINS; SHARP. *Gene*, 1988, vol. 73, 237-44 [0015]
- HIGGINS; SHARP. *CABIOS*, 1989, vol. 5, 151-3 [0015]
- 35 • CORPET et al. *Nuc. Acids. Res.*, 1990, vol. 16, 10881-10 [0015]
- ALTSCHULE. *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-10 [0016]
- BAID et al. *PLoS One*, vol. 6 (9), e24616 [0018] [0114]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co, 1995 [0024]
- BAID et al. *PLoS One.*, vol. 6 (9), e24616 [0066]
- 40 • GASTEIGER et al. *Nucleic Acids Res*, 2003, vol. 31 (13), 3784-8