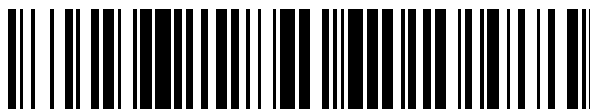


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 794 599**

51 Int. Cl.:

A61K 47/64 (2007.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2014** **PCT/US2014/055021**
87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2015** **WO15038662**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2014** **E 14843936 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020** **EP 3043811**

54 Título: **Composiciones y métodos para la distribución de moléculas en células vivas**

30 Prioridad:

10.09.2013 US 201361876006 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.11.2020

73 Titular/es:

THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM (100.0%)
3369 TAMU
College Station, TX 77843-3369 , US

72 Inventor/es:

PELLOIS, JEAN-PHILIPPE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 794 599 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

Composiciones y métodos para la distribución de moléculas en células vivas

Declaración respecto al listado de secuencias

El listado de secuencias asociado con esta solicitud se proporciona en formato de texto en lugar de una copia en papel y se incorpora por consiguiente por referencia en la memoria. El nombre del archivo de texto que contiene el listado de secuencias es 52683_Seq_ST25.txt. El archivo de texto es de 2 KB, se creó el 9 de septiembre de 2014, y se está presentando por medio de EFS-Web con la presentación de la memoria.

Declaración de los derechos de licencia gubernamental

Esta invención se hizo con el apoyo del gobierno de EE.UU. con el número de subvención de NIH GM087227 y el número de subvención GM087981, concedidas por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno de EE.UU. tiene ciertos derechos en esta invención.

Campo de la invención

La presente descripción se refiere a composiciones y métodos para aumentar la permeabilidad endosómica de células sin efectos sustancialmente adversos en la viabilidad celular. Los métodos y composiciones son útiles para la distribución de moléculas de otra forma impermeables a la célula en las células

Antecedentes

Las estrategias de transducción de proteínas son extremadamente útiles para la investigación y manipulación de procesos celulares. Las proteínas modificadas con fluoróforos *in vitro* y distribuidas en células vivas pueden usarse, por ejemplo, para aplicaciones de captación de imágenes. Además, la determinación *in cellulo* de la estructura de la proteína mediante resonancia magnética nuclear (RMN) se ha conseguido distribuyendo proteínas marcadas de forma isotópica en células humanas vivas. Además, los factores de transcripción que se vuelven permeables a la célula mediante marcado con péptidos de penetración celular (CPPs) o dominios de transducción de proteína (PTDs) han surgido como herramientas potenciales para aplicaciones de regeneración de tejido *ex vivo*. Por ejemplo, los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Klf4 etiquetados con 11R o 9R reprograman los fibroblastos en células madre pluripotentes. El factor de transcripción HoxB4 marcado con el PTD TAT puede usarse también para expandir células madre hematopoyéticas *in vitro* y aumentar potencialmente la tasa de éxito de los procedimientos de trasplante celular. Estas estrategias de distribución de proteína se piensa que representan una alternativa más segura que las estrategias basadas en ADN porque las proteínas presumiblemente no alteran la integridad genómica de las células y porque su actividad se pierde tras la proteólisis. Las células manipuladas con proteínas es, por lo tanto, menos probable que den lugar a cáncer después del trasplante en los pacientes.

Mientras estos estudios ilustran las oportunidades únicas proporcionadas por las tecnologías de transducción de proteínas, los protocolos actuales son a menudo sub-óptimos. Las PTD-proteínas típicamente utilizan la ruta endocítica como una ruta de entrada celular. Sin embargo, la mayoría de PTD-proteínas endocitadas por células permanecen típicamente atrapadas dentro de los endosomas. Como resultado, el nivel de proteína que alcanza el citosol de las células es bajo y los resultados biológicos alcanzados son pobres. Por ejemplo, Nandhini Muthukrishnan et al. (Biochimica et Biophysica Acta 2012, 1820(11), págs. 1734-1743) presentaron que la internalización de TAT etiquetado con tetrametilrodamina, TMR-TAT, da por resultado la muerte celular provocando la liberación de calcio en el citosol de las células. Una posible solución a este problema es aumentar la capacidad con la que las proteínas escapan de la ruta endocítica. Esto es posible con agentes desestabilizantes de la membrana que alteran los endosomas. Los protocolos que combinan agentes endosomolíticos y proteína de interés por tanto se han examinado. Los CPPs modificados con secuencias activas por pH, por ejemplo, se han presentado como aditivos que pueden mejorar la distribución de proteínas en *cis* o en *trans*. Sin embargo, la hidrofobicidad del péptido activo en la membrana es problemático y la eficiencia de la distribución permanece baja. Los CPPs multiméricos ramificados también se han usado de una manera similar. Por ejemplo, Lee Soo-Jin et al. (Journal of Microbiology and Biotechnology 2001, 21(8), págs. 802-807) describen un péptido TAT homodimérico formado por enlace disulfuro y su uso para mejorar la distribución génica a una célula. De forma similar, Carsten Rudolf et al. (Pharmaceutical Research 2004, 21(9), págs. 1662-1669) presenta un péptido HIV-1 TAT dimérico para la distribución génica optimizada a una célula. Una especie ramificada que contiene tres copias de TAT provoca el escape endosómico de diferentes cargas con eficiencia aumentada. En este caso sin embargo, los complicados protocolos sintéticos necesarios para generar dichos reactivos son inconvenientes. Además, a pesar de la mejora de distribución, un problema asociado con estos reactivos activos en la membrana es la citotoxicidad. La especificidad de los agentes endosomolíticos para las membranas endosómicas no se ha caracterizado de forma clara y la lisis de la membrana plasmática de las células se observa a menudo. Además, el nivel de fuga endosómica que puede alcanzarse sin afectar a la viabilidad celular no se ha establecido.

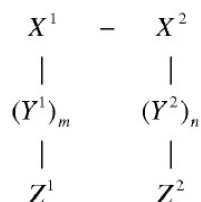
A pesar de los avances en la técnica, permanece una necesidad de métodos y reactivos mejorados para facilitar la distribución de una amplia variedad de moléculas y reactivos al interior de células vivas con alta eficiencia y bajo impacto en la viabilidad de las células diana. Específicamente, permanece una necesidad de métodos y reactivos para

facilitar el escape endosómico de las moléculas y reactivos aplicados a células con una alta eficiencia, baja toxicidad y conveniencia en los protocolos. La presente descripción aborda esta necesidad y proporciona más ventajas relacionadas con ella.

Compendio

- 5 El compendio se proporciona para introducir una selección de conceptos en una forma simplificada que se describen adicionalmente a continuación en la descripción detallada. Este compendio no pretende identificar características clave del tema reivindicado, ni se pretende usar como una ayuda en la determinación del alcance del tema reivindicado.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un compuesto que tiene la fórmula:



- 10 En donde:

X es un resto de unión,

Y es un residuo aminoácido acoplado de forma covalente a un resto hidrófobo,

Z es un resto de péptido de penetración celular (CPP), en donde el resto CPP tiene una carga positiva neta y tiene una secuencia de aminoácidos con el 50% o más de residuos que tienen un grupo guanidinio, y

- 15 m y n son independientemente 0 o 1, en donde

(i) al menos uno de m y n es 1 y el residuo de aminoácido es lisina (K), o

(ii) m y n son 0, y Z^1 y/o Z^2 es un CPP que comprende un residuo lisina (K) lo más en el extremo N unido a un resto hidrófobo.

- 20 En algunas realizaciones, el resto CPP comprende entre 3 y 30 aminoácidos. En algunas realizaciones, el resto CPP comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85% de identidad a la secuencia descrita en la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el resto CPP comprende la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, uno, dos o más, o todos los residuos designados X en SEQ ID NO:1 son residuos de arginina. En algunas realizaciones, el CPP comprende además un residuo de glicina en el extremo C terminal. En algunas realizaciones, el extremo C se modifica para contener un grupo amida. En algunas realizaciones, el CPP de Z^1 y el CPP de Z^2 tienen secuencias de aminoácidos que tienen al menos 85% de identidad entre ellas.

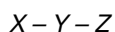
- 25 En algunas realizaciones, al menos uno de m y n es 1. En algunas realizaciones, el resto hidrófobo comprende un grupo de cadena lineal, ramificado o cíclico C_6 - C_{30} . En algunas realizaciones, el grupo de cadena lineal, ramificado o cíclico incluye uno o más heteroátomos seleccionados de N, O y S. En algunas realizaciones, el grupo cíclico es mono-, bi- o tricíclico. En algunas realizaciones, el resto hidrófobo comprende un grupo rodamina. En algunas realizaciones, el grupo rodamina es tetrametilrodamina (TMR). En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido acoplado de forma covalente a un resto hidrófobo es lisina (K).

- 30 En otras realizaciones, m y n son 0, y en donde Z^1 y/o Z^2 es un CPP que comprende un residuo de aminoácido unido a un resto hidrófobo. En realizaciones adicionales, el residuo de aminoácido unido a un resto hidrófobo es el residuo de lisina (K) más en el extremo N en la secuencia de aminoácidos de CPP.

- 35 En algunas realizaciones, X es un residuo de cisteína (C). En algunas realizaciones, X^1 y X^2 son residuos de cisteína (C) unidos por un enlace disulfuro.

En algunas realizaciones, X, Y y/o Z están unidos por enlaces amida. En algunas realizaciones, la combinación de X-Y-Z comprende no más de 30 residuos de aminoácido. En algunas realizaciones, el compuesto es capaz de facilitar la lisis endosómica.

- 40 En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición que tiene la fórmula:



En donde

X es una cisteína (C),

Y es un residuo de aminoácido acoplado de forma covalente a un resto hidrófobo,

Z es un resto de péptido de penetración celular (CPP), en donde el resto CPP comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85% de identidad a la secuencia descrita en SEQ ID NO:1, y en donde el resto CPP tiene una carga positiva neta y tiene una secuencia de aminoácidos con el 50% o más de los residuos teniendo un grupo guanidinio, y

X e Y, e Y y Z están unidos por enlaces amida.

En algunas realizaciones, el compuesto es capaz de formar un homodímero mediante la formación de un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína (C) N terminales.

En algunas realizaciones, el resto CPP comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 85% de identidad a la secuencia descrita en SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, uno, dos o más, o todos los residuos designados X en SEQ ID NO:1 son residuos de arginina. En algunas realizaciones, el CPP comprende además un residuo de glicina en el extremo C terminal. En algunas realizaciones, el extremo C se modifica para contener un grupo amida.

En algunas realizaciones, Y es lisina (K).

En algunas realizaciones, el resto hidrófobo comprende un grupo rodamina. En algunas realizaciones, el grupo rodamina es tetrametilrodamina (TMR).

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para mejorar la permeabilidad endosómica en una célula, comprendiendo el método poner en contacto una célula con un compuesto de la presente descripción.

En algunas realizaciones, la célula se pone en contacto bajo condiciones suficientes para permitir la endocitosis del compuesto. En algunas realizaciones, la célula se pone en contacto con una concentración del compuesto de al menos 1 μ M. En algunas realizaciones, la célula se pone en contacto con una concentración del compuesto de al menos 5 μ M. En algunas realizaciones, la célula está en un cultivo que carece de albúmina. En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto la célula con una molécula impermeable a la célula. En algunas realizaciones, la célula se obtiene de un sujeto vivo y se pone en contacto con el compuesto *ex vivo*. En algunas realizaciones, la célula está en un sujeto vivo y se pone en contacto *in vivo*. En realizaciones adicionales, la célula se pone en contacto *in vivo* administrando una cantidad del compuesto al sujeto efectiva para mejorar la permeabilidad endosómica de la célula. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método de distribución de una molécula impermeable a la célula al citosol de una célula, comprendiendo el método poner en contacto una célula con un compuesto de la presente descripción y una molécula impermeable a la célula bajo condiciones suficientes para permitir la endocitosis.

En algunas realizaciones, la célula se pone en contacto con una concentración del compuesto de al menos 1 μ M. En algunas realizaciones, la molécula impermeable a la célula es un péptido, un polímero que incluye polipéptidos y ácidos nucleicos, o un compuesto farmacéutico de molécula pequeña. En algunas realizaciones, el polipéptido es un factor de transcripción. En algunas realizaciones, la molécula impermeable a la célula no está unida de forma covalente al compuesto. En algunas realizaciones, la molécula impermeable a la célula tiene una carga positiva neta. En algunas realizaciones, la célula se obtiene de un sujeto vivo y se pone en contacto con el compuesto y la molécula impermeable a la célula *ex vivo*. En algunas realizaciones, la célula está en un sujeto vivo y se pone en contacto con el compuesto y molécula impermeable a la célula *in vivo*. En realizaciones adicionales, la célula se pone en contacto *in vivo* administrando una cantidad del compuesto al sujeto efectivo para distribuir una molécula impermeable a la célula al citosol de la célula. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método de inducción de pluripotencia en una célula *ex vivo*, comprendiendo el método poner en contacto una célula obtenida a partir de un sujeto con un compuesto de la presente descripción y un factor de transcripción bajo condiciones suficientes para permitir la endocitosis, y cultivar la célula para obtener pluripotencia de la célula.

En algunas realizaciones, la célula se obtiene de tejido somático en el sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En algunas realizaciones, el factor de transcripción es uno de Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar posteriormente la célula pluripotente, o una célula hija de la misma, al sujeto.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método de expansión de una célula madre *ex vivo*, comprendiendo el método poner en contacto una célula madre con un compuesto de la presente descripción y un factor de transcripción bajo condiciones suficientes para permitir la endocitosis, y cultivar la célula para obtener la expansión de la célula. En algunas realizaciones, la célula madre es una célula madre hematopoyética. En algunas realizaciones, el factor de transcripción se selecciona del grupo que consiste en HoxB4, HoxA4/10, Gata2, Gf1, AML1, JunB, NF-Y, Bmi1Ezh2, Dmmt3a, Cbx7, p18, p21, p27, p57, PTEN, Myc, Fbxw7 y similares.

Descripción de los dibujos

Los aspectos precedentes y muchas de las ventajas relacionadas de esta descripción se apreciarán más fácilmente mientras las mismas se entenderán mejor por referencia a la siguiente descripción detallada, cuando se tomen en conjunto con los dibujos de acompañamiento, en donde:

5 La Figura 1 ilustra la estructura y masa esperada del constructo TAT.

La Figura 2 ilustra la estructura y masa esperada de un constructo dTAT que incorpora una unión de enlace disulfuro (indicado con una flecha).

La Figura 3 ilustra la estructura y masa esperada del constructo acTAT.

10 Las Figuras 4A-4D ilustran que la distribución citosólica de dTAT en células vivas es eficiente y supera a sus homólogos monoméricos. (Figura 4A) Localización celular de acTAT y dTAT en células vivas. Se incubaron células HeLa durante 1 h con acTAT (20 μ M) o dTAT (5 μ M), se lavaron y se capturaron en imágenes con un objetivo 100x. Las imágenes de fluorescencia muestran liberación citosólica para células incubadas con dTAT mientras que acTAT muestra una distribución punteada indicativa de atrapamiento endosómico. Barras de escala, 10 μ m. Se anota que se obtuvieron resultados similares a la distribución de acTAT punteada para TAT (hasta 10 μ M; no se muestra). (Figura 4B) se observa fluorescencia de dTAT en el citosol de aproximadamente todas las células. La imagen monocroma invertida (negro = señal de fluorescencia, blanco= sin señal) de células HeLa incubadas con dTAT 5 μ M durante 1 h. Se usó SYTOX® azul (2 μ M) como un indicador de muerte celular. Barras de escala, 50 μ m. (Figura 4C) eficiencia de distribución citosólica de acTAT, TAT y dTAT en células HeLa vivas. Las células se incubaron con acTAT, TAT y dTAT (1-20 μ M) durante 1 h. El número de células con distribución de fluorescencia citosólica y nuclear detectable se contó y se dividió por el número de células totales para cada concentración probada (%) (1.000 células/experimento, los experimentos se realizaron por triplicado, promedio y desviaciones estándar correspondientes representadas). (Figura 4D) la absorción total de dTAT en células HeLa responde aproximadamente de forma lineal a la concentración de dTAT presente en el medio. Las células se cultivaron en una placa de 48 pocillos y se incubaron con dTAT (1-10 μ M) durante 1 h. Se evaluó la absorción relativa de forma cuantitativa midiendo la fluorescencia total de lisatos celulares y se normalizó como se trata en los métodos (300.000 células/experimento, experimentos por triplicado, promedio/desviaciones estándar normalizadas y correspondientes representadas).

La Figura 5 ilustra que la localización celular de acTAT y dTAT es diferente después de la incubación con células vivas. La fluorescencia (paneles superiores) e imágenes de campo brillante (paneles de abajo) (usando objetivo 100X) de células HeLa incubadas con acTAT 20 μ M (paneles de la izquierda) y dTAT 5 μ M (paneles de la derecha). El péptido acTAT presenta una distribución punteada de fluorescencia mientras que dTAT exhibe una distribución de fluorescencia citosólica y nuclear. Las imágenes de campo brillante no muestran cambio en la morfología de células HeLa tras la distribución peptídica. Barra de escala, 10 μ m.

La Figura 6 ilustra que la distribución de fluorescencia citosólica y nuclear de dTAT es dependiente de la concentración. Las células HeLa se incubaron con concentración variable de dTAT (1, 2, 2,5, 2,25, 2,5, 2,75, 3, 4, 5 μ M). Las células se lavaron y se capturaron en imágenes. Las imágenes monocromas invertidas (objetivo 20X) muestran un aumento dramático en la distribución citosólica del péptido entre 2-5 μ M. Aunque no se muestra aquí, el número de células en cada imagen es aproximadamente el mismo que se determina por captación de imágenes de campo brillante. Las células que presentan una distribución punteada de fluorescencia no son claramente visibles bajo estas condiciones de captación de imágenes. El análisis adicional de estas células usando un objetivo 100X muestran claramente una distribución de punteado de fluorescencia indicativo de péptidos atrapados en endosomas. Barras de escala, 50 μ m.

Las Figuras 7A-7B ilustran las imágenes de fluorescencia de la distribución de dTAT en células neuronales de ganglio de raíz dorsal F11 (DRG-F11). Después de 1 h de incubación con dTAT (5 μ M), se realizó la captación de imágenes con objetivos 20 X (Figura 7A) y 100X (Figura 7B).

Las Figuras 8A-8C ilustran que dTAT media el escape endosómico. (Figura 8A) Efecto de inhibidores endocíticos en la distribución celular de dTAT. Las células HeLa se pre-trataron con amilorida 50 μ M o bafilomicina 200 nM durante 30 y 20 min respectivamente, se lavaron, y se incubaron con dTAT 5 μ M e inhibidor. Ambos inhibidores bloquearon la distribución del citosol y núcleo de las células. La captación de imágenes de fluorescencia muestra una distribución de punteado de TMR en presencia de bafilomicina (1.000 células/experimento, los experimentos se realizaron por triplicado, promedio y desviaciones estándar correspondientes representadas). Barra de escala, 10 μ m. (Figura 8B) dTAT provoca la liberación citosólica de moléculas atrapadas dentro de endosomas. Se muestra una ilustración esquemática de las etapas experimentales (arriba). Primero, las células se incubaron con DEAC-K9 5 μ M durante 1 h y se lavaron. Las imágenes monocromas invertidas muestran una distribución punteada de fluorescencia después de la incubación con DEAC-K9 solo. Las mismas células se incubaron después con dTAT 5 μ M durante 1 h. Las imágenes muestran una redistribución de DEAC-K9 al citosol y el núcleo (inhibido por bafilomicina). Barras de escala, 10 μ m. (Figura 8C) La actividad endosomolítica de dTAT es altamente eficiente. Las células HeLa que expresan SNAPH2B se incubaron con dTAT 5 μ M y SNAP-Surface® 488 5 μ M. Las imágenes de fluorescencia muestran acumulación de SNAP-Surface® 488 en el núcleo. El análisis de la señal verde indica que entre el 50% y el 90% de SNAP-Surface®

488 escapó de los endosomas. Los paneles pequeños muestran fluorescencia citosólica y nuclear de TMR. Barras de escala, 10 μ m.

La Figura 9 ilustra la estructura y masa esperada de DEAC-K9.

Las Figuras 10A-10D ilustran que la distribución mediada por dTAT no afecta a la supervivencia y proliferación celular. (Figura 10A) dTAT no afecta a la morfología celular. Las células COLO 316 se incubaron con dTAT 5 μ M durante 1 h y se captaron imágenes 1 y 24 h después de la incubación. (Figura 10B) dTAT no es tóxico para las células bajo condiciones donde se consigue el escape endosómico eficiente. Se incubaron células HeLa con dTAT 1-10 μ M durante 1 h. La viabilidad celular se evaluó mediante un ensayo de exclusión SYTOX® Verde 1, 24 y 48 h después de la incubación (1.000 células/experimento, experimentos por triplicado, promedio y desviaciones estándar representadas). (Figura 10C) dTAT no afecta a la proliferación celular. Las células HeLa se incubaron con dTAT 5 μ M durante 1 h o se dejaron sin tratar. La proliferación se evaluó usando un ensayo MTT durante hasta 36 h después de la incubación (150.000 células/experimento, experimentos por triplicado, promedio y desviaciones estándar representadas). (Figura 10D) Las células que contienen dTAT citosólico se dividen. Se incubaron células HeLa con dTAT 5 μ M durante 1 h. Después de la incubación (t = 0 h), se obtuvieron una imagen de fluorescencia (panel de la izquierda) y un lapso de tiempo. Las imágenes de campo brillante muestran un suceso de división de una célula que presenta distribución citosólica de fluorescencia. Barras de escala, 10 μ m.

La Figura 11 ilustra la localización celular de dTAT después de 1 h de incubación con la línea celular neuronal Neuro-2a (panel izquierdo) y fibroblastos dérmicos humanos primarios (HDF) (panel derecho). Las células se incubaron con dTAT, se lavaron, y se captaron imágenes con un objetivo 100x. Las imágenes de fluorescencia muestran la liberación citosólica para células incubadas con dTAT. La exclusión de SYTOX® azul (2 μ M) se usó para determinar que las células captadas en imágenes no tienen una membrana plasmática comprometida (no mostrado). Barra de escala, 10 μ m.

La Figura 12 ilustra que las células tratadas con dTAT proliferan a una velocidad idéntica a las células no tratadas. Se incubaron células HeLa, Neuro-2a y HDF con dTAT 5 μ M durante 1 h o se dejaron sin tratar. La proliferación se evaluó usando un ensayo MTT durante hasta 36 h después de la incubación (150.000 células/experimento, experimentos por triplicado, promedio y desviaciones estándar representadas).

La Figura 13 ilustra que el escape endosómico mediado por dTAT puede repetirse. Se co-incubaron células HeLa con dTAT (5 μ M) y DEAC-K9 (5 μ M) durante 1 h (etapa 1) (ambas filas). Después de lavar, se co-incubaron dTAT (5 μ M) y SNAP-Surface® 488 (5 μ M) en presencia (fila inferior) o ausencia de bafilomicina (200 nM) (fila superior) (etapa 3). Barras de escala, 10 μ m.

Las Figuras 14A-14B ilustran que dTAT media la distribución de dos cargas de forma simultánea dentro de células vivas. (Figura 14A) Las células HeLa que expresan SNAP-H2B se incubaron con dTAT 5 μ M, SNAP-Surface® 488 5 μ M y DEAC-K9 5 μ M. Las imágenes de fluorescencia (RGB y monocromo invertido) muestran localización citosólica y nuclear de dTAT (fluorescencia, panel izquierdo superior), DEAC-K9 (fluorescencia, panel derecho superior) y SNAP-Surface® 488 (fluorescencia, panel medio superior). Además, la señal de SNAP-Surface se acumuló en el núcleo como se muestra en la Figura 8C. (Figura 14B). Se incubaron células HeLa con dTAT 5 μ M, SNAP-Surface® 488 5 μ M y DEAC-K9 5 μ M. Las imágenes de fluorescencia y monocroma invertida muestran la localización de fluorescencia citosólica y nuclear de dTAT (fluorescencia, panel izquierdo superior), DEAC-K9 (fluorescencia, panel derecho superior) y SNAP-Surface® 488 (fluorescencia, panel medio superior). Barras de escala, 10 μ m.

La Figura 15 ilustra que la administración de dTAT no provoca una fuerte respuesta transcripcional en células, y que las células se recuperan rápidamente de la penetración citosólica de dTAT. El análisis de micromatriz de genoma completo se realizó en células tratadas con dTAT 5 μ M durante 1 h para determinar si los patrones transcripcionales están influidos. El análisis se realizó inmediatamente, 1 h o 24 h después del tratamiento con dTAT. El gráfico representa los valores de intensidad de la micromatriz de muestras tratadas frente a no tratadas (mismas etapas de incubación pero sin péptido). Las líneas rectas representan el límite de cambio de intensidad de dos veces.

Las Figuras 16A-16C ilustra la distribución de proteínas intactas y funcionales en trans que usan dTAT. (Figura 16A) EGFP intacto puede distribuirse dentro de células vivas. Se co-incubaron células HeLa con EGFP (10 μ M) y dTAT (5 μ M). Las imágenes de fluorescencia muestran una distribución citosólica homogénea de EGFP. Barras de escala, (objetivo 100X: 10 μ m, objetivo 20X: 100 μ m). (Figura 16B) La distribución mediada por dTAT de TXT-Cre mejora la expresión de EGFP en células que contienen un vector con el gen *egfp* corriente arriba de una secuencia *loxP*-STOP-*loxP*. HeLa transfectada con el plásmido pCALNL-GFP que contiene un gen *egfp* corriente arriba de una secuencia *loxP*-STOP-*loxP* se incubaron durante 1 h con o TAT (5 μ M) o dTAT (5 μ M) en presencia de TAT-Cr (1 μ M). TAT-Cr (1 μ M) solo se incubó con células también para comparación. La adición de dTAT aumentó el número de células EGFP⁺ (47%) (TAT-Cr solo, 2,6%) y su capacidad para distribuir TAT-Cre dentro de células sobrepasó la de TAT (4,8%). El número de células en las imágenes era aproximadamente la misma como se evalúa por microscopía de campo brillante (1.000 células/experimento, experimentos por triplicado, promedio y desviaciones estándar representadas). Barras de escala, 100 μ m. (Figura 16C) Distribución mediada por dTAT de un anticuerpo. Las células HeLa se co-incubaron con FITC-anti-ATP5A (20 μ g/mL) y dTAT (5 μ M) durante 1 h a 37°C. FITC-anti-ATP5A se

distribuye en el citosol de células y tiñe la mitocondria tubular (tinciones intensas, más claramente visibles en la imagen que tiene zoom). Barras de escala, objetivo 100X: 10 μm , imagen en zoom: 2 μm .

La Figura 17 ilustra la distribución mediada por dTAT de EGFP intacto en diferentes líneas celulares. Las células HeLa (paneles superiores) y NIH 3T3 (paneles de abajo) se incubaron con EGFP (10 μM) y dTAT (5 μM) durante 1 h, se lavaron y se capturaron las imágenes. Las imágenes muestran una distribución de fluorescencia citosólica homogénea de EGFP en células HeLa y NIH 3T3. Barras de escala, 10 μm .

Las Figuras 18A-18C ilustra que dTAT y EGFP no interactúan cuando se co-incubaban. (Figura 18A) El espectro de emisión de fluorescencia de EGFP (1 μM) (par FRET dador) (EGFP, Ex/Em 488/508 nm) se excitó a 488 nm. El espectro muestra un pico de emisión intenso a alrededor de 510 nm y un pequeño pico hombro alrededor de 548 nm. (Figura 18B) El espectro de emisión de fluorescencia de una disolución de EGFP (1 μM) y dTAT (5 μM) (par FRET aceptor) (TMR, Ex/Em 556/580 nm) se excitó a 488 nm. El espectro muestra un pico de emisión intenso a alrededor de 510 nm y un pequeño pico hombro alrededor de 548 nm. La contribución de TMR al espectro de fluorescencia de EGFP (fluorescencia híbrida) se determinó midiendo la emisión de fluorescencia de una disolución de dTAT (5 μM) excitada a 488 nm (no mostrado). El espectro de la disolución con EGFP y dTAT es casi idéntico al espectro de EGFP solo (la señal híbrida de fluorescencia de TMR se restó). (Figura 18C) Espectro de emisión de fluorescencia de EGFP-CK(TMR) ligado. Usando la unión de proteína expresada, EGFP se unió químicamente a CK(TMR) como se describe para producir EGFP-CK(TMR). Se usó EGFP-CK(TMR) como control positivo para la señal FRET. Tras la excitación a 488 nm, se observa un aumento dramático en la fluorescencia entre 560-630 nm (fluorescencia máx. aproximadamente a 580 nm), indicativo de una señal FRET debido a la gran proximidad entre fluoróforos. Este aumento en la intensidad de fluorescencia no se observó en el espectro en la parte b) (indicativo de ninguna interacción entre EGFP y dTAT). La emisión de todas las muestras se barrió de 500 a 650 nm.

Las Figuras 19A-19B ilustran que el anticuerpo FITC-anti-ATP5a se co-localiza con una proteína mitocondrial etiquetada de forma fluorescente expresada en células vivas después de la distribución mediada por dTAT. (Figura 19A) Las células que expresan TagCFP-mito (izquierda) se capturaron en imágenes usando los filtros FITC y CFP. Las mitocondrias tubulares se observaron claramente solo en el canal CFP. En un experimento separado, dTAT (5 μM) y FITC-anti-ATP5A (20 $\mu\text{g/mL}$) se incubaron durante 1 h con células que expresan TagCFP-mito. Las imágenes monocromas invertidas muestran la co-localización de FITC-anti-ATP5A (canal FITC) y TagCFP-mito (canal CFP). Barras de escala, 2 μm . (Figura 19B) Para confirmar que la tinción mitocondrial es específica de FITC-anti-ATP5A, un anticuerpo sin un epítipo intracelular, FITC-anti-IgG, se distribuyó con dTAT, FITC-anti-IgG (20 $\mu\text{g/mL}$) y dTAT (5 μM) se incubaron con células durante 1 h. Las imágenes monocromas invertidas muestran una distribución de fluorescencia citosólica homogénea (arriba). En contraste, las células que se incubaron con FITC-anti-ATP5A muestran la fluorescencia en estructuras tubulares (abajo). Barras de escala, imagen con zoom: 2 μm , objetivo 100X: 10 μm .

Las Figuras 20A-20C ilustran que la distribución mediada por dTAT mejora y permite el control de la actividad transcripcional de HoxB4. (Figura 20A) La distribución mediada por dTAT de HoxB4 y TAT-HoxB4 mejora la expresión de un reportero de luciferasa bajo un promotor dependiente de HoxB4. Las NIH 3T3 transfectadas con un reportero de luciferasa se incubaron durante 1,5 h con o HoxB4 o TAT-HoxB4 (200 nM) en presencia o ausencia de dTAT (3 μM). La adición de dTAT da por resultado un aumento de 53,1 y 307,4 veces en la inducción de luciferasa obtenida con Hoxb4 y TAT-Hoxb4, respectivamente. La incubación con TAT-mCherry (200 nM) y/o dTAT (3 μM) sirve como controles negativos (400.000 células/experimento, experimentos por duplicado, promedio y desviaciones estándar representadas). (Figura 20B) La cantidad de DEAC-K9 distribuido en el citosol y núcleo de células vivas puede valorarse. Las células HeLa se incubaron con dTAT (5 μM) y cantidades crecientes de DEAC-K9 (1, 2,5, 5, 10, 20 μM). La intensidad de fluorescencia de células que representa la liberación citosólica se evaluó por microscopia (representación de señal de fluorescencia usando pseudo-color, escala de color: azul = la menor intensidad, rojo = la mayor intensidad) y se comparó a la fluorescencia total de los lisatos celulares. En ambos análisis, la intensidad de fluorescencia de células responde de forma lineal a la concentración de DEAC-K9 en el medio. (Microscopio: 1.000 células/experimento, fluorómetro: 300.000 células/experimento; experimentos por triplicado, promedio y desviaciones estándar representadas). Barras de escala, 10 μm . (Figura 20C) La inducción de la expresión de luciferasa por distribución mediada por dTAT de HoxB4 puede controlarse. Las células NIH 3T3 se co-incubaron con HoxB4 (25-200 nM) y dTAT (3 μM) y la inducción de luciferasa se midió como se describe en (a) (400.000 células/experimento, experimentos por duplicado, promedio y desviaciones estándar representadas).

La Figura 21 ilustra la estructura y masa esperada de un constructo "dímero dTAT no reducible" (nrdTAT).

Las Figuras 22A-22B ilustran la distribución citosólica de nrdTAT en células vivas. Las células HeLa se incubaron con nrdTAT 2,5-5 μM (Figura 22A) y nrdTAT 5-10 μM (Figura 22B) durante 1 h. Imágenes de campo brillante (paneles izquierdos), imágenes de fluorescencia monocroma (paneles centrales; blanco = señal de fluorescencia, negro = sin señal); y viabilidad celular con SYTOX azul (2 μM) se usaron como un indicador de muerte celular (paneles derechos). Los datos muestran la distribución citosólica de nrdTAT en células HeLa a ambas concentraciones. Barras de escala, 50 μm (imagen 20X monocroma invertida).

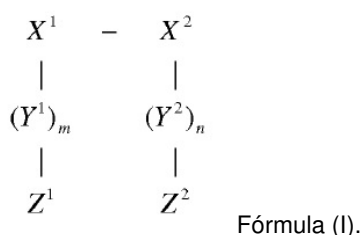
La Figura 23 ilustra la absorción peptídica en células HeLa como una función de la concentración de péptido presente en el medio. La absorción de los tres péptidos por células HeLa se midió como una función de concentración (μM).

Las células se incubaron con o acTAT (5-25 μ M), TAT (5-25 μ M) o dTAT (1-10 μ M) y la fluorescencia total de lisatos celulares en una placa de 96 pocillos se midió usando un lector de placas. La fluorescencia de cada muestra se normalizó a contenido de proteína total en el lisato celular, como se determinó por un ensayo de proteína de Bradford. El dato muestra un aumento lineal en la absorción de fluorescencia de células incubadas con dTAT. El tampón de lisis usado en este experimento contiene DTT 2 mM. dTAT se reduce al TAT monomérico tras este tratamiento. Por consiguiente, la fluorescencia normalizada de dTAT se dividió por dos (dTAT/2) para comparar la absorción de dTAT a la de TAT (la señal de una molécula de dTAT da una señal dos veces la de una molécula de TAT internalizado en este ensayo).

Descripción detallada

Las estrategias de distribución macromolecular utilizan típicamente la ruta endocítica como una ruta de entrada celular. Sin embargo, el atrapamiento endosómico limita gravemente la eficiencia con que las macromoléculas penetran al espacio citosólico de las células. Las estrategias para mejorar el escape endosómico a menudo llevan a citotoxicidad aumentada por la falta de especificidad de los agentes endosomolíticos por la membrana endosómica. Esta descripción describe el sorprendente descubrimiento de que la dimerización de un péptido de penetración celular (CPP), tal como un dominio del activador de transcripción que trans-activa VIH, o trans-activador de transcripción (denominado en la presente memoria como "dominio TAT CPP"), penetra en las células vivas escapando de los endosomas con una eficiencia particularmente alta. Como se usa en la presente memoria, los términos péptido de penetración celular (CCP) y dominio de transducción de proteína (PTD) pueden usarse de forma intercambiable como péptidos que promueven la absorción celular de diversas cargas moleculares, por consiguiente, los términos se refieren a péptidos que pueden promover la distribución intracelular de diversas cargas cis o trans. Por mediación de la fuga endosómica, el dímero CPP facilita la distribución de pequeñas moléculas, péptidos y proteínas en células cultivadas después de un sencillo procedimiento de co-incubación. Como se describe en mayor detalle a continuación, la incorporación de dos dominios TAT CCP en un compuesto dimérico dio por resultado un nuevo reactivo (dTAT) que facilitó la distribución de proteínas y moléculas pequeñas en células vivas con extrema eficiencia y sin afectar de forma negativa a la viabilidad y proliferación celular. También se describen sorprendentes ventajas adicionales relacionadas con el nuevo compuesto dTAT. Por ejemplo, se consiguió la distribución citosólica en la mayoría de células en un cultivo, en diversas líneas celulares diferentes, y con solo una cantidad relativamente pequeña de material restante atrapado dentro de endosomas intactos. La distribución no necesitó interacciones de unión entre dTAT y la carga diana, múltiples especies moleculares fueron capaces de distribuirse de una vez, y la distribución pudo repetirse en las mismas células. Sorprendentemente, la distribución mediada por dTAT no impactó de forma perceptible a la viabilidad y proliferación celular. La distribución mediada por dTAT se evaluó adicionalmente con HoxB4, un factor de transcripción con potencial terapéutico para la expansión *in vitro* de células madre hematopoyéticas. De forma específica, la adición de dTAT al medio de incubación aumentó la inducción de un reportero de luciferasa 24 veces por encima del obtenido por tratamiento con HoxB4 solo y 61 veces por encima del obtenido con TAT-HoxB4 (un constructo de proteína condensado con TAT) solo. Finalmente, la actividad transcripcional de HoxB4 puede también controlarse de forma precisa cambiando simplemente la cantidad de proteína administrada de forma extracelular. En general, como se describe en la presente memoria, los inventores demostraron que esta nueva estrategia de distribución basada en los nuevos dímeros CPP, tal como los nuevos reactivos dTAT, es extremadamente útil para ensayos basados en células, aplicaciones de captación de imágenes celulares, manipulación *ex vivo* y reprogramación de células, y administraciones *in vivo* de agentes terapéuticos, entre otras aplicaciones.

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la descripción proporciona un compuesto que tiene la Fórmula (I):



En el compuesto representado por la Fórmula (I), X es un resto de unión, Y es un residuo de aminoácido acoplado de forma covalente a un resto hidrófobo, y Z es un resto de péptido de penetración celular (CPP). Se entenderá que las designaciones de superíndice (es decir, ¹ y ²) indican que los diversos subcomponentes designados así no se necesita que sean idénticos, pero opcionalmente pueden incluir variaciones. Por ejemplo, Z¹ y Z² pueden ser restos CPP idénticos o diferentes mientras cada uno satisfaga las necesidades de un resto CPP. Cualquier descripción proporcionada en la presente memoria con referencia a un subcomponente sin un superíndice designado se refiere a la categoría general de subcomponentes y pueden aplicarse específicamente a uno o ambos subcomponentes específicos en el compuesto. Las designaciones de los subíndices m y n son independientemente 0 o 1, que indican ausencia o presencia del subcomponente específico, respectivamente. En algunas realizaciones, al menos uno de m y n es 1. En algunas realizaciones, solo uno de m y n es 1. En algunas realizaciones, tanto m como n son 1. En algunas realizaciones específicas, descritas en más detalle a continuación, tanto m como n son 0. En cualquier realización en

donde m y/o n sea 0, se entenderá que los correspondientes subcomponentes X y Z están unidos directamente sin ningún subcomponente Y intermedio. El compuesto descrito en la presente memoria puede denominarse en la presente memoria alternativamente como el compuesto dimérico, el compuesto endosomolítico o un compuesto de la presente descripción.

- 5 En algunas realizaciones, el resto de péptido de penetración celular (CCP) tiene entre 3 y 30 aminoácidos.

Como se usa en la presente memoria, un “péptido” o “polipéptido” se refiere a polímeros de dos o más aminoácidos unidos por un enlace amida (es decir, un “enlace peptídico”). Los péptidos comprenden típicamente hasta o incluyen 50 aminoácidos y pueden ser lineales o cíclicos. Como se usa en la presente memoria, un “aminoácido” se refiere a cualquiera de los 20 aminoácidos que se dan de forma natural encontrados en proteínas, D-estereoisómeros de los aminoácidos que se dan de forma natural (p.ej., D-treonina), aminoácidos no naturales (p.ej., aminoácidos sintéticos con cadenas laterales diferentes en comparación de los aminoácidos que se dan de forma natural), y aminoácidos modificados químicamente. Cada uno de estos tipos de aminoácidos no es mutuamente excluyente. Los α -aminoácidos comprenden un átomo de carbono al que se une un grupo amino, un grupo carboxilo, un átomo de hidrógeno y un grupo distintivo denominado como una “cadena lateral”. Las cadenas laterales de aminoácidos que se dan de forma natural se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, hidrógeno (p.ej., como en glicina), alquilo (p.ej., como en alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina), alquilo sustituido (p.ej., como en treonina, serina, metionina, cisteína, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, arginina y lisina), arilalquilo (p.ej., como en fenilalanina y triptófano), arilalquilo sustituido (p.ej., como en tirosina), y heteroarilalquilo (p.ej., como en histidina).

- 20 Las siguientes abreviaturas se usan para los 20 aminoácidos que se dan de forma natural: alanina (Ala; A), asparagina (Asn; N), ácido aspártico (Asp; D), arginina (Arg; R), cisteína (Cys; C), ácido glutámico (Glu; E), glutamina (Gln; Q), glicina (Gly; G), histidina (His; H), isoleucina (Ile; I), leucina (Leu; L), lisina (Lys; K), metionina (Met; M), fenilalanina (Phe; F), prolina (Pro; P), serina (Ser; S), treonina (Thr; T), triptófano (Trp; W), tirosina (Tyr; Y) y valina (Val; V).

- 25 Los aminoácidos, y, más específicamente, sus cadenas laterales, se conocen bien y pueden caracterizarse por su(s) característica(s) química(s). Por ejemplo, las cadenas laterales del aminoácido pueden estar cargadas de forma positiva, cargadas de forma negativa, o ser neutras. El pH de una disolución afecta a la naturaleza cargada de ciertas cadenas laterales, como se sabe por los expertos en la técnica. Ejemplos no limitantes de cadenas laterales que pueden estar cargadas de forma positiva incluyen histidina, arginina y lisina. Ejemplos no limitantes de cadenas laterales que pueden estar cargadas de forma negativa incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Ejemplos no limitantes de cadenas laterales que pueden caracterizarse como neutras incluyen glicina, alanina, fenilalanina, valina, leucina, isoleucina, cisteína, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, metionina, prolina y triptófano.

- 35 Los aminoácidos pueden caracterizarse también por la polaridad de sus cadenas laterales. Las cadenas laterales polares, que son típicamente más hidrófilas que las cadenas laterales no polares, incluyen, por ejemplo, aquellas de serina, treonina, tirosina, cisteína, asparagina y glutamina. Las cadenas laterales no polares, que son típicamente más hidrófobas que las cadenas laterales polares, incluyen, por ejemplo, aquellas de glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina, fenilalanina y triptófano. Se puede determinar la polaridad de una cadena lateral usando técnicas convencionales conocidas en la técnica que implican determinaciones de electronegatividad del átomo y evaluaciones estructurales tridimensionales de las cadenas laterales. Se pueden comparar también las hidrofobicidades/hidrofiliidades de las cadenas laterales usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como comparar el coeficiente de partición de octanol/agua de cada aminoácido.

- 40 Como se usa en la presente memoria, un “aminoácido modificado químicamente” se refiere a un aminoácido cuya cadena lateral se ha modificado químicamente. Por ejemplo, una cadena lateral puede modificarse para comprender un resto de señalización, tal como un fluoróforo o una radioetiqueta. Una cadena lateral puede modificarse para comprender un nuevo grupo funcional, tal como un tiol, ácido carboxílico o grupo amino. Los aminoácidos modificados después de la traducción se incluyen también en la definición de aminoácidos modificados químicamente.

- 45 En algunas realizaciones, el CPP tiene una carga positiva neta.

En algunas realizaciones, el CPP tiene una secuencia de aminoácidos con 50% o más de los residuos de aminoácido que tienen un grupo guanidinio en la cadena lateral. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos puede tener 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o todos sus aminoácidos, o cualquier intervalo derivable en ellos, teniendo un grupo guanidinio en la cadena lateral. Un grupo guanidinio se representa por la Fórmula (II):

- 50
$$-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH}_2^+)-\text{NH}_2 \quad \text{Fórmula (II)}.$$

- En algunas realizaciones, uno o más de los aminoácidos que tienen un grupo guanidinio es un residuo de arginina (Arg; R). Como se entiende en la técnica, un residuo de Arg tiene una cadena lateral con una cadena lineal alifática de 3 carbonos, cuyo extremo distal está terminado con un grupo guanidinio. En algunas realizaciones, uno o más de los aminoácidos que tienen un grupo guanidinio es un análogo de Arg, en donde la cadena lateral está modificada o es sintéticamente diferente de alguna manera. Dichas modificaciones pueden incluir la adición o supresión de carbonos en la cadena lateral, respecto a la Arg que se da de forma natural, dando por resultado una cadena lateral más larga o más corta que está terminada con un grupo guanidinio. Además, la cadena lateral puede modificarse para

contener estructuras ramificadas u otros grupos funcionales. En algunas realizaciones, el grupo guanidinio puede estar presente en una estructura ramificada. En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido puede comprender más de un grupo guanidinio. La generación de análogos de Arg puede conseguirse según técnicas conocidas que incluyen introducir las modificaciones previstas a la Arg que se da de forma natural y generar aminoácidos sintéticos *de novo* que contienen uno o más grupos guanidinio.

En algunas realizaciones, el resto CPP, como se representa por Z en la Fórmula (I), comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o cualquier intervalo o porcentaje incluido en ella, de la identidad a la secuencia XKKXXQXXX (SEQ ID NO:1). Se nota que cada designación X que aparece en SEQ ID NO:1 se refiere independientemente a una arginina (Arg; R) o un residuo que no se da de forma natural con un grupo guanidinio, como se describe anteriormente. En algunas realizaciones, el CPP comprende la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el CPP comprende o consiste en el aminoácido descrito en SEQ ID NO:1 con una glicina adicional en el extremo C terminal. En algunas realizaciones, el resto CPP consiste en la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO:1. En cualquiera de estas realizaciones, una, dos o más, o todas de las designaciones X en SEQ ID NO:1 se refieren a residuos de arginina (Arg; R). En algunas realizaciones, la secuencia CPP de Z¹ y la secuencia CPP de Z² tiene secuencias de aminoácidos que son al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% o cualquier intervalo o porcentaje incluido en ellas, idénticos el uno al otro.

Como se usa en la presente memoria, los términos “porcentaje de identidad” o “porcentaje idéntico” se refieren al porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia polipeptídica que son idénticos con la secuencia de aminoácidos de una molécula especificada (tal como SEQ ID NO:1) después de alinear las secuencias candidata y de estudio para alcanzar el porcentaje máximo de identidad. Por ejemplo, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de proteína puede determinarse por comparación por pares de las dos secuencias usando la interfase bl2seq en el sitio web del Centro nacional de información de biotecnología (NCBI), Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU., 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894, EE.UU. La interfase bl2seq permite el alineamiento de secuencia usando la herramienta BLAST descrita por Tatiana, A., et al., “Blast 2 Sequences – A New Tool for Comparing Protein and Nucleotide Sequences”, FEMS Microbiol. Lett. 174:247-250 (1999). Los siguientes parámetros de alineamiento pueden usarse: Matriz = BLOSUM62; penalización de apertura de hueco = 11; penalización de extensión de hueco = 1; x_dropff de hueco = 50; Esperado = 10,0; tamaño de palabra = 3; y filtro = apagado.

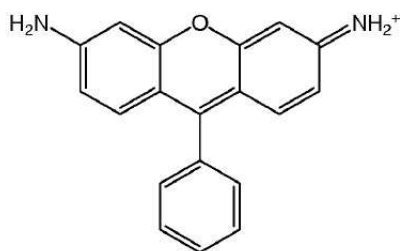
Como se indica anteriormente, en algunas realizaciones del compuesto representadas por la Fórmula (I), al menos uno de m y n es 1. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el compuesto comprende al menos un residuo de aminoácido acoplado de forma covalente a un resto hidrófobo, como se representa por Y en la Fórmula (I). Sin estar atado a cualquier teoría particular, se cree que la presencia de uno o más restos hidrófobos en la(s) posición(ones) Y en el compuesto dimérico crea(n) una pared-cabeza lipófila en el extremo amino del (de los) dominio(s) CPP. Esta pared-cabeza lleva probablemente a una mayor afinidad del compuesto dimérico total para la membrana del endosoma y facilita la actividad endosomolítica de los dominios CPP en el compuesto dimérico.

En algunas realizaciones, el resto hidrófobo comprende entre 6 y 40 átomos de carbono. En algunas realizaciones, el resto hidrófobo comprende un grupo de cadena lineal, ramificado o cíclico. En algunas realizaciones, el grupo cíclico es o comprende un grupo monocíclico, bicíclico o tricíclico.

En algunas realizaciones, el resto hidrófobo comprende además uno o más heteroátomos seleccionados de nitrógeno (N), oxígeno (O) y azufre (S).

De forma ejemplar, los restos hidrófobos no limitantes incluyen: moléculas aromáticas (por ejemplo, xantenos, antraceno, indoles y similares), aminoácidos (por ejemplo, residuos de histidina, triptófano, fenilalanina, tirosina y similares), fluoróforos, moléculas lipófilas, moléculas alifáticas (por ejemplo, ácidos grasos y similares), y similares. En algunas realizaciones, el resto hidrófobo es lipófilo.

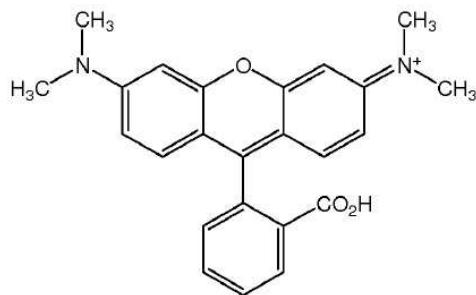
En realizaciones específicas, el resto hidrófobo comprende un grupo rodamina, o derivado del mismo. Los grupos rodamina comprenden una familia de compuestos químicos relacionados que se usan normalmente como tintes debido a su capacidad para fluorescer. La estructura de rodamina central se representa por la Fórmula (III):



Fórmula (III).

La rodamina y sus derivados se conocen generalmente por ser solubles en agua por su carga positiva (muchos derivados se proporcionan en forma de sal). A pesar de esta solubilidad, la rodamina y sus derivados se incluyen en la presente memoria como un tipo, o parte, de un "resto hidrófobo" por las propiedades hidrófobas y lipófilas dadas a estos compuestos por el núcleo aromático.

- 5 En algunas realizaciones, el resto hidrófobo comprende un derivado de rodamina. En algunas realizaciones, el derivado de rodamina es tetrametilrodamina (TMR), representado por la Fórmula (IV):



Fórmula (IV).

- 10 En algunas realizaciones, la TMR es una 5(6)-carboxi TMR para facilitar la unión a un residuo de aminoácido del compuesto. El residuo de aminoácido acoplado de forma covalente a un resto hidrófobo puede ser cualquiera de los aminoácidos descritos anteriormente susceptibles de dicho acoplamiento. En algunas realizaciones, como se describe en más detalle a continuación, el aminoácido es una lisina (Lys; K).

- Como se describe anteriormente, en ciertas realizaciones específicas, tanto m como n son 0. En dichas realizaciones, el compuesto aún comprende al menos un resto hidrófobo como se describe en la presente memoria. Sin embargo, en vez de estar acoplado de forma covalente a un aminoácido que es distinto de los aminoácidos del CPP, el al menos un resto hidrófobo está acoplado de forma covalente a al menos uno de los aminoácidos en al menos una de las dos secuencias CPP. En estas realizaciones, es preferible que el al menos un aminoácido (acoplado al resto hidrófobo) esté situado en una posición en al menos una secuencia CPP que esté más cerca del extremo que está próximo a (es decir, unido a) el subcomponente X del compuesto, en comparación con el extremo que no está próximo a (es decir, no unido a) el subcomponente X del compuesto. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido (acoplado al resto hidrófobo) está situado en una posición en la secuencia CPP que es la posición terminal o en 1, 2, 3, 4 o 5 posiciones de residuo de aminoácido de la posición terminal que está próxima (es decir, unida a) el subcomponente X del compuesto. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido (acoplado al resto hidrófobo) es el residuo de lisina más en el extremo N en la secuencia de aminoácidos de CPP.

- 25 Los restos de unión, como se representan en la Fórmula (I) por X, puede ser cualquier resto químico que pueda facilitar una unión estable útil para unir dos unidades monoméricas que comprenden cada una un resto CPP y resto hidrófobo, como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, X¹-X² como se representa en la Fórmula (I) representa una única estructura de unión. En algunas realizaciones, X¹ y X² representan cada uno un resto distinto, y opcionalmente diferente, que en combinación son capaces de formar una unión estable entre las dos unidades monoméricas. En algunas realizaciones, la unión estable puede ser uno o más enlaces covalentes entre una pluralidad de subcomponentes. En otras realizaciones, la unión estable puede ser un enlace iónico.

- Un ejemplo ilustrativo, no limitante, de restos de unión como se representa por X en la Fórmula (I) es el residuo de aminoácido cisteína (Cys; C), que es capaz de formar un enlace disulfuro con otro residuo de cisteína. Por consiguiente, en una realización, X¹ y X² son ambos residuos de cisteína, que se unen mutuamente por un enlace disulfuro. En otro ejemplo ilustrativo, uno de X¹ y X² es una molécula de biotina, y el otro de X¹ y X² es un resto que se une específicamente a biotina, tal como avidina, estreptavidina, neutravidina y similares. Como se entiende fácilmente en la técnica, la biotina y su homólogo de unión específico, tal como avidina, estreptavidina, neutravidina y similares, forman un enlace fuerte, no covalente, que se acerca a la fuerza de un enlace covalente.

- Se apreciará que la unión entre las unidades monoméricas proporcionadas por los restos de unión no necesita ser permanente. En vez de eso, la unión sería suficientemente estable para mantener la estructura dimérica total durante la captura endosómica y el escape endosómico en el citosol. A partir de ahí, la unión no se necesitaría más, y en algunos casos se rompe preferiblemente para conservar la viabilidad celular. Por ejemplo, como se describe a continuación, se mantiene un constructo dimérico dTAT ejemplar mediante un enlace disulfuro entre dos unidades monoméricas. Véase la Figura 2. En esta realización, el enlace disulfuro puede escindirse en el citosol, dando por resultado unidades monoméricas que han reducido relativamente (o no) la actividad de alteración de la membrana a partir de ahí.

De forma alternativa, la unión entre las unidades monoméricas puede ser una unión no reducible. Un constructo ejemplar con una unión no reducible entre dos monómeros TAT se ilustra en la Figura 21 y se mostró que retenía la

funcionalidad de permeación a la célula de dTAT, como se describe en más detalle a continuación. Esto demuestra que la unión específica que soporta un constructo dimérico dTAT puede modificarse o sustituirse sin afectar de forma adversa a la funcionalidad.

En algunas realizaciones, los subcomponentes del compuesto X, Y y/o Z como se representan en la Fórmula (I) (p.ej., X¹, Y¹ y/o Z¹) están unidos por enlaces amida. Por ejemplo, en algunas realizaciones, cada uno de X¹, Y¹ y/o Z¹ (y/o X², Y² y/o Z²) comprenden al menos un aminoácido, en donde el al menos un aminoácido de cada uno de X¹, Y¹ y/o Z¹ (y/o X², Y² y/o Z²) están unidos por enlaces amida. En algunas realizaciones, solo dos de X¹, Y¹ y Z¹ (y/o X², Y² y Z²) están unidos por enlaces amida. En algunas realizaciones, todos de X¹, Y¹ y Z¹ (y/o X², Y² y Z²) están unidos por enlaces amida. En algunas realizaciones, los subcomponentes X, Y y/o Z representados en la Fórmula (I) (p.ej., X¹, Y¹ y/o Z¹) están unidos indirectamente mediante subcomponentes intermedios. Los subcomponentes pueden ser aminoácidos intermedios y, por consiguiente, pueden estar unidos a los subcomponentes X, Y y/o Z por enlaces amida.

En algunas realizaciones, la combinación de X-Y-Z como una subunidad monomérica del compuesto representado en la Fórmula (I), es decir, X¹-Y¹-Z¹ y/o X²-Y²-Z², comprende 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 y 35 residuos de aminoácido.

Como se describe en más detalle a continuación, la administración de suficiente concentración de TAT monomérico (TAT), como se ilustra en la Figura 1 y como se representa en el contexto de la Fórmula (I) mediante el monómero X-Y-Z, se administra en concentraciones suficientes a las células, dando por resultado alguna fluorescencia citosólica. Esto indica que en concentración suficiente, el compuesto monomérico TAT es capaz de algún grado de auto-dimerización durante la endocitosis. Un monómero que puede auto-ensamblarse dentro de los endosomas durante la captura endosómica proporciona varios beneficios potenciales, tal como reducir más la interacción de membrana no específica dimerizándose solo en el compuesto activo de membrana tras la endocitosis.

Por consiguiente, en otro aspecto, la presente descripción proporciona un compuesto que tiene la fórmula X-Y-Z, en donde X es un residuo de cisteína, Y es un residuo aminoácido acoplado de forma covalente a un resto hidrófobo, y Z es un resto de péptido de penetración celular (CPP). El resto CPP tiene una carga positiva neta y tiene una secuencia de aminoácidos con el 50% o más de los residuos que tienen un grupo guanidinio. Preferiblemente, los subcomponentes X e Y, y los subcomponentes Y y Z están unidos por enlaces amida. Como con el compuesto del aspecto anterior, el compuesto descrito en la presente memoria puede denominarse alternativamente como el compuesto monomérico, el compuesto endosomolítico o un compuesto de la presente descripción.

El compuesto de este aspecto es capaz de formar un homodímero mediante la formación de un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína del extremo N de dos compuestos.

El CPP se describe anteriormente. En algunas realizaciones, el resto de péptido de penetración celular (CPP) tiene entre 3 y 30 aminoácidos. En realizaciones específicas, los residuos que tienen un grupo guanidinio pueden ser independientemente un residuo de aminoácido arginina (Arg; R), o un aminoácido sintético, que no se da de forma natural, tal como un análogo de Arg sintético.

En algunas realizaciones, el CPP tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o cualquier intervalo o porcentaje incluido en ella, de identidad a la SEQ ID NO:1, descrita anteriormente. En algunas realizaciones el CPP comprende la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el CPP comprende o consiste en el aminoácido descrito en SEQ ID NO:1 con una glicina adicional en el extremo C terminal. En algunas realizaciones, el resto CPP consiste en la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO:1.

En algunas realizaciones, Y es un residuo de lisina (Lys; K).

El resto hidrófobo se describe anteriormente. En algunas realizaciones específicas, el resto hidrófobo comprende un grupo de cadena lineal, ramificado o cíclico de C6-C30. En algunas realizaciones, el grupo cíclico es o comprende un grupo monocíclico, bicíclico o tricíclico. En algunas realizaciones, el resto hidrófobo comprende además uno o más heteroátomos seleccionados de nitrógeno (N), oxígeno (O) y azufre (S). En algunas realizaciones, el resto hidrófobo comprende una rodamina o derivado de rodamina. En algunas realizaciones, el derivado de rodamina es tetrametilrodamina (TMR), representada por la Fórmula (IV).

En algunas realizaciones, la combinación de X-Y-Z comprende 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 y 35 residuos de aminoácido. En algunas realizaciones, los subcomponentes X, Y y/o Z representados están unidos indirectamente mediante subcomponentes intermedios. Los subcomponentes pueden ser aminoácidos intermedios y, por consiguiente, pueden estar unidos a los subcomponentes X, Y y/o Z mediante enlaces amida.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método de mejora de la permeabilidad endosómica en una célula, comprendiendo el método poner en contacto una célula con un compuesto de la descripción, como se describe en la presente memoria anteriormente.

En este aspecto, la célula se pone en contacto bajo condiciones suficientes para permitir la endocitosis de una molécula impermeable a la célula. Por ejemplo, la célula puede mantenerse en condiciones de cultivo conocidas en la técnica que son favorables para la viabilidad celular y, por consiguiente, suficientes para que la célula mantenga una ruta endocítica operativa. En algunas realizaciones, la célula se cultiva *in vitro*. En realizaciones adicionales, la célula se cultiva *in vivo* en medio que carece de albúmina, que puede, en ciertos ejemplos, reducir la actividad de los compuestos descritos. En otras realizaciones, la célula se obtiene a partir de un sujeto vivo y se pone en contacto *ex vivo*. En dichas realizaciones, pueden aplicarse técnicas de cultivo conocidas para mantener la célula *ex vivo* durante un periodo de tiempo. En algunas realizaciones, como se describe a continuación, la célula está *in vivo* en un sujeto vivo y el compuesto endosomolítico se administra al sujeto.

En algunas realizaciones, la célula se pone en contacto con una concentración del compuesto endosomolítico de al menos 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 3 μM , 4 μM , 5 μM , o superior. El término de concentración puede determinarse con respecto al volumen del entorno local para la célula. Por ejemplo, la concentración puede determinarse en términos del volumen del medio de cultivo celular en contacto con la célula.

En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto la célula con una molécula impermeable a la célula. Las moléculas impermeables a la célula son agentes químicos que normalmente no cruzan una membrana celular sin ayuda y preferiblemente provocan un efecto previsto en la célula tras o después de introducirse en el citosol. La única limitación teórica es que las moléculas deben ser capaces de ser endocitadas, lo que impone ciertas limitaciones de tamaño. Ejemplos ilustrativos, no limitantes, de moléculas impermeables a la célula incluyen péptidos, polipéptidos, proteínas (p.ej., polipéptidos que exceden aproximadamente los 50 aminoácidos), ácidos nucleicos, otros polímeros, composiciones farmacéuticas, y similares. En algunas realizaciones, los polipéptidos o proteínas son factores de transcripción. Factores de transcripción ejemplares se tratan en más detalle a continuación.

En algunas realizaciones, la molécula impermeable a la célula está unida o conjugada al compuesto, de forma covalente u otra forma. Sin embargo, en otras realizaciones, la molécula impermeable a la célula no está unida o conjugada al compuesto. Por ejemplo, como se describe en más detalle a continuación, varias moléculas impermeables a la célula que incluyen factores de transcripción y tintes que no estaban unidos a dTAT se distribuyeron con éxito en el citosol de diversas células cuando se administraron de forma coordinada con dTAT, pero no unidos o conjugados a él. Una ventaja potencial es que esto permite que la concentración o cantidad de la molécula impermeable a la célula de "carga" se ajuste fácilmente independientemente del compuesto endosomolítico de la presente descripción.

Como se describe a continuación, el compuesto dTAT tiene una carga positiva neta. Se teoriza que sin cargas opuestas, la molécula impermeable a la célula no interactuará con el compuesto endosomolítico (tal como dTAT descrito a continuación), evitando por consiguiente la interferencia con sus propiedades endosomolíticas. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la molécula impermeable a la célula tiene una carga positiva neta. Sin embargo, en otras realizaciones, la molécula impermeable a la célula puede tener una carga negativa neta. En estas realizaciones, la molécula impermeable a la célula puede ponerse en contacto con la célula con reactivos adicionales conocidos normalmente que protegen de forma efectiva la carga negativa de la molécula impermeable a la célula. Esta protección de carga evita la interacción perjudicial, si la hay, entre la molécula impermeable a la célula y el compuesto de la descripción. Por ejemplo, se sabe que compuestos químicos tales como fosfato de calcio y DEAE-dextrano o reactivos basados en lípidos catiónicos pueden usarse para crear un entorno más electrostáticamente neutro alrededor de una molécula de ADN y, por consiguiente, mejorar los efectos de la carga negativa del ADN. Un lípido catiónico ejemplar es LipofectamineTM (Invitrogen/Life Technologies, CA, EE.UU.).

Como se demuestra a continuación y se ilustra en la Figura 14, el compuesto dTAT facilitó la distribución simultánea de DEAC-K9 y SNAP-Surface® 488. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto la célula con una pluralidad de diferentes moléculas impermeables a la célula.

Como se demuestra a continuación, las administraciones del agente endosomolítico y la molécula impermeable a la célula puede repetirse múltiples veces sin detrimento de la viabilidad celular. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto la célula con el compuesto endosomolítico y una o más moléculas impermeables a la célula en un momento posterior a la primera ocasión de poner en contacto la célula con el compuesto endosomolítico y una o más moléculas impermeables a la célula. En algunas realizaciones, la etapa de puesta en contacto se repite 1, 2, 3, 4, 5 o más veces, cada vez potencialmente con la misma o diferente molécula impermeable a la célula.

En algunas realizaciones, la célula se obtiene de un sujeto vivo y se pone en contacto *ex vivo* con el compuesto endosomolítico de la descripción y la molécula impermeable a la célula. Por ejemplo, una célula obtenida de un sujeto puede ponerse en contacto *ex vivo* con el compuesto y un agente, tal como cualquier factor de transcripción conocido para facilitar la pluripotencia. Una vez que se consigue el grado necesario de pluripotencia, la célula, o progenie de la misma, puede administrarse de nuevo al sujeto u otro sujeto que lo necesite. En otra realización, la célula, o progenie de la misma, se diferencian más según métodos conocidos que pueden incluir la puesta en contacto adicional con el compuesto de la presente descripción. Se describe además que la(s) célula(s) diferenciada(s) puede(n) entonces administrarse de nuevo al sujeto o un individuo diferente que lo necesite.

Como se indica anteriormente, otro método descrito incluye poner en contacto una célula *in vivo* con el compuesto endosomolítico de la presente descripción. En descripciones adicionales, la célula se pone en contacto también con una cantidad efectiva de una molécula impermeable a la célula que se dirige a una necesidad terapéutica. En algunas descripciones, el compuesto endosomolítico y/o la molécula impermeable a la célula está dirigido a una o más células o tipos de células específicas en el cuerpo del sujeto. Esto puede conseguirse usando diversos vehículos de distribución bien reconocidos tal como liposomas, nanopartículas, partículas tipo virus (VLPs) y similares, que están diseñados para dirigirse específicamente a células de interés. Por ejemplo, la célula puede ser una célula aberrante o cancerosa con un receptor superficial conocido susceptible de ser objetivo de la partícula. La partícula puede distribuir el compuesto endosomolítico (junto con un agente impermeable a la célula) que provoca la muerte de la célula. En otro ejemplo, la célula es una célula madre que es objetivo del compuesto endosomolítico (junto con un agente impermeable a la célula) que induce la diferenciación de la célula madre en una célula hija necesaria, por ejemplo, para regenerar el tejido o una población celular.

El sujeto puede ser cualquier animal, tal como mamífero, reptil, artrópodo, molusco y similares. En algunas realizaciones, el sujeto mamífero es un primate (que incluye un mono, un simio y un humano), un roedor (que incluye un ratón, una rata, una cobaya y similares), un gato, un perro, una vaca, un caballo, una oveja, una cabra, un cerdo y similares.

Por consiguiente, en un aspecto relacionado, la presente descripción también proporciona un método de distribución de una molécula impermeable a la célula al citosol de una célula, comprendiendo el método poner en contacto una célula con un compuesto endosomolítico, como se describe anteriormente, y una molécula impermeable a la célula en condiciones suficientes para permitir la endocitosis.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método de inducción de pluripotencia en una célula *ex vivo*. El método comprende i) poner en contacto una célula obtenida de un sujeto con un compuesto endosomolítico, como se describe anteriormente, y un factor de transcripción en condiciones suficientes para permitir la endocitosis, y ii) cultivar la célula para obtener la pluripotencia de la célula.

Como se usa en la presente memoria, los términos “pluripotente” y “pluripotencia” se usan para referirse a la capacidad o potencial de una célula para desarrollarse en una pluralidad de diferentes tipos celulares. Como se usa, el término pretende incluir todas las categorías de células madre, tal como células totipotentes, células pluripotentes, células multipotentes (que incluyen células mesenquimales), y células oligopotentes. Se apreciará que muchas técnicas se conocen para inducir la pluripotencia a partir de células somáticas a través de manipulaciones genéticas para obtener células que son precursores útiles para unos tipos celulares de interés diferentes.

Ejemplos ilustrativos, no limitantes, de factores de transcripción conocidos que son útiles en este aspecto para promover la pluripotencia incluyen Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, y similares.

El método de este aspecto proporciona la ventaja de inducir la pluripotencia mediante la distribución eficiente de los factores de transcripción apropiados sin efectos perjudiciales en las células. Como se describe, la distribución puede repetirse y puede aplicarse a una pluralidad de diferentes moléculas impermeables a la célula. Como se describe en la presente memoria, las células pluripotentes pueden entonces administrarse de nuevo al sujeto fuente u otro sujeto que lo necesita. En realizaciones alternativas, las células pluripotentes se diferencian más en cualquier tipo celular preferido. Los métodos para diferenciar células pluripotentes en cultivos *ex vivo* se conocen en la técnica, y pueden incluir administraciones adicionales de un compuesto endosomolítico de la presente descripción. Como se describe en la presente memoria, las células diferenciadas pueden mantenerse en cultivo y/o pueden administrarse de nuevo al sujeto fuente u otro sujeto, tal como para propósitos terapéuticos o de investigación apropiados.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método de expansión de una célula madre *ex vivo*. El método comprende i) poner en contacto una célula madre con un compuesto endosomolítico de la presente descripción y un factor de transcripción en condiciones suficientes para permitir la endocitosis, y ii) cultivar la célula para obtener la expansión de la célula.

Como se usa en la presente memoria, el término “expansión de una célula madre” se refiere a la propagación de una población celular a partir de una célula o células madre alimentadoras iniciales, en donde los miembros de la población expandida retienen características de la célula o células alimentadoras iniciales, como un grado necesario de pluripotencia. Las técnicas de expansión incluyen proporcionar un entorno de cultivo apropiado para el crecimiento y división celular. Este entorno puede incluir una combinación de medios, suplementos, estructuras de crecimiento y reactivos y puede implicar o no la necesidad de poblaciones alimentadoras sanas o medios acondicionados. Las células madre expandidas son beneficiosas o útiles terapéuticamente como herramientas de cribado de fármaco para propósitos de investigación básica, y similares. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas expandidas pueden administrarse a un sujeto que ha tenido terapia de cáncer de médula ósea ablativa en un esfuerzo de repoblar la médula ósea y la sangre con diversas líneas de células sanguíneas.

En algunas realizaciones, la célula madre es una célula madre hematopoyética.

En algunas realizaciones, el factor de transcripción HoxB4, HoxA4/10, Gata2, Gf1, AML1, JunB, NF-Y, Bmi1Ezh2, Dmrt3a, Cbx7, p18, p21, p27, p57, PTEN, Myc, Fbxw7, y similares.

Se entenderá que cualquier realización, característica, elemento, definición o descripción general proporcionada para cualquier aspecto de la descripción puede aplicarse a cualquier otro aspecto de la descripción sin limitación, a menos que se indique explícitamente. Por consiguiente, cualquier realización tratada en la presente memoria puede implementarse con respecto a cualquier método, agente o composición de la invención, y viceversa. Además, pueden usarse agentes y composiciones de la invención para conseguir métodos de la invención.

El uso de la palabra “un” o “una”, cuando se usa en conjunto con el término “que comprende” en la presente memoria puede significar “uno”, pero si es coherente con el significado de “uno o más”, “al menos uno”, y “uno o más de uno”.

A lo largo de esta memoria, el término “aproximadamente” se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, empleándose el método para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos de estudio.

Los términos “comprender”, “tener” e “incluir” son verbos de unión de final abierto. Cualquier forma o tiempo de uno o más de estos verbos, tal como “comprende”, “que comprende”, “tiene”, “que tiene”, “incluye” y “que incluye”, son también de final abierto. Por ejemplo, cualquier método que “comprende”, “tiene” o “incluye” una o más etapas no está limitado a poseer solo esas una o más etapas y también cubre otras etapas no enumeradas.

Como una alternativa a o además de “que comprende”, cualquier realización en la presente memoria puede enumerar “que consiste en”. La frase de transición “que consiste en” excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en la reivindicación.

Lo siguiente es una descripción del descubrimiento de que los nuevos dímeros TAT (dTAT) median sorprendentemente la fuga endosómica y facilitan la distribución eficiente de pequeñas moléculas, péptidos y proteínas en células cultivadas mediante un procedimiento de co-incubación sencilla. dTAT se formó por creación de un puente disulfuro entre dos péptidos TAT. La distribución citosólica se consiguió sin impactar en la viabilidad o proliferación celular. Se distribuyeron múltiples moléculas de forma simultánea, y la distribución a las mismas células fue susceptible a la repetición sin pérdida de eficacia. En general, la siguiente descripción establece una nueva estrategia de distribución que es extremadamente útil para ensayos basados en células, aplicaciones de captación de imagen celular, la manipulación *ex vivo* y la reprogramación de células, y otras aplicaciones. Esta descripción se proporciona con el propósito de ilustrar, no limitar, el tema descrito en la presente memoria.

Resultados

Un dímero unido por disulfuro de TAT penetra al citosol de las células de forma más eficiente que los homólogos monoméricos.

El CPP derivado de un dominio del activador de transcripción que trans-activa VIH con la secuencia XKKXXQXXX (véase SEQ ID NO:1, en donde todos los residuos designados con X son argininas (Arg; R); denominado en la presente memoria como “dominio TAT CPP”) se usó como una plantilla para el diseño de un vehículo de distribución dimérico. Se añadió una glicina C terminal (Gly; G) al dominio CPP para propósitos sintéticos para evitar la racemización tras la unión a la resina durante la síntesis peptídica en fase sólida. Sin embargo, la glicina C-terminal no se cree que tenga un papel en la funcionalidad del dominio TAT CPP, lo que se demuestra a continuación. Finalmente, se incorporó una amida C-terminal (C(=O)-NH₂) para evitar cualquier carga adicional proporcionada por el carboxílico típico en el extremo C cuando se desprotona. Una lisina modificada con el fluoróforo tetrametilrodamina (TMR) se introdujo para la captación de imágenes de fluorescencia y se añadió una cisteína en el extremo N de TAT para permitir la dimerización mediante la formación de enlace disulfuro (Figura 1). Los enlaces disulfuro son relativamente estables dentro de los endosomas, pero se escinden tras entrar en el citosol reductor. Por consiguiente, un constructo TAT dimérico (Figura 2) sería estable y endosomolítico dentro de los endosomas, pero se volvería monomérico y perdería su actividad de alteración de la membrana tras entrar al citosol. El producto monomérico, CK(TMR)-TAT se purificó como un monómero reducido. El término “TAT”, como se usa en la presente memoria, se refiere al producto monomérico (es decir, CK(TMR)-TAT) y no al dominio TAT CPP, a menos que se indique otra cosa. La incubación en medio oxigenado y la oxidación del tiol de cisteína libre de TAT generó el dímero (CK(TMR)TAT)₂ (denominado en la presente memoria como “TAT dimérico” o “dTAT”), en donde cada unidad de TAT monomérico está unida por medio de un enlace disulfuro entre los residuos de citosina finales. TAT y dTAT se caracterizaron por análisis de espectro HPLC y MALDITOF MS. El CK(ε-NH-TMR)TAT (TAT) purificado mostró un tiempo de retención (tr) de 14,2 min (TAT, masa esperada = 2039,16, masa observada = 2040,66). dTAT se obtuvo incubando TAT en tampón oxigenado toda la noche. Después de la purificación por HPLC, dTAT mostró un único pico con un tiempo de retención (tr) de 22,7 min (dTAT, masa esperada = 4076,30, mas observada: M+1/1H⁺ = 4084,21 Da, M+2/2H⁺ = 2041,32). El dTAT puro se mezcló con una disolución de TCEP (50 mM) en agua y se dejó reaccionar durante 15 min. El cromatograma de HPLC mostró un pico con tr = 14,3 min y fue idéntico al tiempo de retención de TAT puro (no mostrado). De forma alternativa, el tiol de TAT (es decir, CK(TMR)TAT) se acetamidó para obtener un péptido (denominado en la presente memoria como “acTAT”), que no puede dimerizar (Figura 3). El acTAT se caracterizó mediante análisis de espectro de HPLC y MALDI-TOF MS de acTAT puro (ta = 8,93 min) (masa esperada: 2096,18, masa observada: 2096,31) (no mostrado).

Los péptidos TAT, dTAT y acTAT se incubaron durante 1 h con varias líneas celulares y la internalización se evaluó mediante microscopio de fluorescencia. Las Figuras 4A-4D muestran acTAT (1-20 μ M) localizado en una distribución punteada coherente con la acumulación del péptido dentro de endosomas. En contraste, la señal de fluorescencia de dTAT era o punteada (por debajo de 2 μ M) o distribuida en el citosol y núcleo (por encima de 5 μ M). Véase también la Figura 5. De forma interesante, el número de células con una distribución de fluorescencia difusa aumentó dramáticamente entre 2 y 5 μ M de dTAT (Figura 4C y Figura 6). La cantidad total de dTAT dentro de las células (citosol+endosomas), medida por fluorescencia global de lisatos, se correlacionó sin embargo casi de forma lineal con la concentración de dTAT administrado extracelularmente (Figura 4D). Estos datos demuestran que dTAT se endocita y que escapa al citosol de las células por encima de una concentración umbral. La distribución citosólica de dTAT se alcanzó en células HeLa, NIH 3T3, HaCaT, y COLO 316. Brevemente, la distribución de dTAT en el citosol y el núcleo de células vivas se alcanzó en múltiples líneas celulares. Las líneas celulares de HeLa, NIH 3T3, COLO 316 y HaCaT se incubaron con dTAT 5 μ M durante 1 h, se lavaron y se capturaron en imágenes. La señal de fluorescencia detectada estaba en el citosol y núcleo de las células. Después de la captación de imágenes, las células se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5% durante 24 h, se lavaron y se capturaron en imágenes de nuevo. La morfología celular no cambió después de 24 h. La viabilidad celular se evaluó por exclusión de la tinción nuclear impermeable a la célula SYTOX® Azul en un punto temporal de 1 h y 24 h. La fluorescencia de TMR en el punto temporal de 24 h fue diferente a la obtenida en el punto temporal de 1 h presumiblemente por la degradación intracelular del péptido (no mostrado). En todos los casos, las células no se tiñeron con SYTOX® Azul, indicando que su membrana plasmática no estaba comprometida y que las células estaban vivas. Similar a acTAT, TAT se localizó dentro de endosomas a hasta 10 μ M. Sin embargo, a 20 μ M, muchas células presentan fluorescencia citosólica, que indica que TAT reproduce algo de la actividad de dTAT dimerizando posiblemente *in situ*. Brevemente, la localización de TAT celular después de la incubación con células vivas pareció depender de su concentración en el medio extracelular. Se hicieron imágenes de fluorescencia monocroma invertida (negro = señal de fluorescencia, blanco = sin señal) de células HeLa incubados con 10 o 20 μ M de TAT durante 1 h. TAT representó distribución punteada de fluorescencia a TAT 10 μ M mientras que un TAT 20 μ M mostró un aumento significativo en la población de células que presentan distribución de fluorescencia citosólica y nuclear (no mostrado).

dTAT penetra en el citosol de células normalmente resistentes a la transfección

Las células neuronales de ganglio de raíz dorsal F11 (DRG-F11) son notoriamente difíciles de transfectar. La exposición de dTAT se probó en células DRG-F11 para determinar si las dificultades de transfección también planteaban una barrera para dTAT. Las células DRG-F11 se incubaron durante 1 hora con dTAT (5 μ M). La captación de imágenes se realizó con objetivos 20 X (Figura 18A) y 100 X (Figura 18A), que ilustran que dTAT penetra en el citosol de las células DRG-F11.

dTAT penetra en las células mediante endocitosis seguido por escape endosómico

Para probar si el escape endosómico está implicado en la distribución de dTAT, los efectos de la amilorida, un inhibidor de macropinocitosis, y bafilomicina, un inhibidor de acidificación endosómica, se evaluaron. La Figura 8A muestra que la amilorida y bafilomicina inhibieron la distribución citosólica de dTAT, sugiriendo que dTAT transita a través de la ruta endocítica antes de entrar al citosol de las células. Para confirmar estos resultados, las células se incubaron con DEAC-K9, un péptido de polilisina fluorescente (véase la Figura 9) que se acumula dentro de los endosomas. Las células se lavaron entonces y se incubaron con dTAT (Figura 8B). Aunque solo se observó una distribución punteada de fluorescencia con células incubadas con DEAC-K9 solo, la adición posterior de dTAT llevó a la redistribución de la señal de DEAC a lo largo del citosol y el núcleo. Esta redistribución se inhibió sin embargo por la bafilomicina. Estos datos demuestran que dTAT se acumula dentro de los endosomas que contienen ya DEAC-K9 y que dTAT escapa de los endosomas de una forma tal que se acompaña de liberación de DEAC-K9. En general estos datos demuestran que dTAT penetra en las células en un proceso de dos etapas que incluye la endocitosis seguido por escape de la ruta endocítica.

La fuga endosómica mediada por dTAT es eficiente

Como se demuestra anteriormente, la distribución citosólica de dTAT indica un proceso de escape endosómico significativamente más eficiente que el que puede observarse para acTAT o TAT. Sin embargo, la fluorescencia citosólica de dTAT posiblemente oscurezca la señal que permanece dentro de los endosomas. En dicho hipotético escenario, el escape endosómico de dTAT parecería más dramático que lo que realmente es. Para establecer de forma más precisa la eficiencia con que dTAT media la fuga endosómica, dTAT se co-incubó con SNAP-Surface® 488, un fluoróforo verde impermeable a la célula que puede reaccionar con la marca de fusión de proteína SNAP (véase, p.ej., Sun, X. et al. "Development of SNAP-Tag Fluorogenic Probes for Wash-Free Fluorescence Imaging", *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology* 12:2217-2226 (2017), incorporado en la presente memoria por referencia en su totalidad. El experimento se realizó en células que expresan el constructo de histona SNAP-H2B de manera que SNAP-Surface® 488 etiquetaría el núcleo de las células tras la distribución. Las células incubadas con dTAT y SNAP Surface® 488 presentaron una tinción nuclear (Figura 8C) mientras que las células incubadas con SNAP-Surface® 488 solo no lo hicieron. Brevemente, SNAP-Surface® 488 se mostró que entra en las células por medio de endocitosis. Las células HeLa se incubaron con SNAP-Surface® 488 5 μ M durante 1 h, se lavaron y se capturaron imágenes. Las imágenes monocromas invertidas mostraron una distribución de fluorescencia punteada procedente de SNAP-Surface® 488. Las células HeLa se incubaron con SNAP-Surface® 488 5 μ M y dTAT 2,5 μ M

(una concentración en que la incubación de dTAT no da por resultado liberación citosólica significativa) durante 1 h, se lavaron y se captaron imágenes. Las imágenes monocromas invertidas de nuevo mostraron acumulación de SNAP-Surface® 488 en orgánulos endocíticos (distribución punteada) y la colocalización con señal de TMR. Las imágenes de campo brillante mostraron que la morfología de las células HeLa no cambiaron después de la absorción de SNAP-Surface® 488 y/o dTAT (no mostrado). Estos datos confirman adicionalmente que la fluorescencia detectada es intracelular. Además, debido a que SNAP-Surface® 488 se acumula en el núcleo después de la distribución, la fluorescencia citosólica se disminuye y la cantidad de moléculas fluorescentes que permanecen dentro de los endosomas se revela más claramente. Como se resalta en la Figura 8C, las células con un núcleo etiquetado de forma brillante contenían solo unos pocos endosomas tenues. Debería notarse que la fluorescencia de SNAP-Surface® 488 se desactiva (80%) antes de que reaccione con la etiqueta de fusión SNAP. Cuando se tiene en cuenta la desactivación, el análisis de la señal de fluorescencia indicó que entre el 50% y el 90% de la fluorescencia escapó de los endosomas en las células captadas en imagen (se analizaron 100 células transfectadas).

La distribución citosólica mediada por dTAT no afecta a la viabilidad celular, proliferación celular, o la ruta endocítica usada por dTAT

Debido a que el escape endosómico mediado por dTAT es muy eficiente, un problema es que dTAT tendría hipotéticamente un impacto negativo en la fisiología celular. Para abordar este problema, la toxicidad asociada con dTAT se estableció 1, 24 y 48 h después de la incubación con células HeLa. Sorprendentemente, la fracción de células muertas estuvo por debajo de 5% a dTAT 5 µM, una concentración suficiente para alcanzar la penetración citosólica eficiente en aproximadamente todas las células (Figura 10B). La morfología de las células tratadas con dTAT fue además idéntica a la de las células no tratadas (Figura 10A) (la distribución de la señal de TMR es diferente después de 24 h, presumiblemente por la degradación peptídica). Además, la Figura 10C muestra que las células HeLa tratadas con dTAT (5 µM) crecen a la misma velocidad que las células no tratadas. Finalmente, las células que contienen una señal de fluorescencia citosólica indicativa de escape endosómico de dTAT eficiente se observó que se dividen por microscopio (Figura 10D). En general estos datos demuestran que las células sobreviven a la penetración de dTAT y crecen normalmente.

Para determinar si esta falta demostrada de efecto negativo en la morfología y proliferación celular está limitada a células HeLa, se realizaron ensayos similares para otros tipos de células. La Figura 11 ilustra la localización celular de dTAT después de 1 h de incubación con la línea celular neuronal Neuro-2a (panel izquierdo) y fibroblastos dérmicos humanos primarios (HDF) (panel derecho). Las células se incubaron con dTAT, se lavaron, y se captaron en imágenes con un objetivo 100x. Las imágenes de fluorescencia muestran liberación citosólica para las células incubadas con dTAT. La exclusión de SYTOX® azul (2 µM) se usó para determinar que las células captadas en imágenes no tienen una membrana plasmática comprometida. La Figura 12 ilustra gráficamente la velocidad de proliferación (absorbancia en un ensayo MTT) de células HeLa, Neuro-2a, y HDF tratadas y no tratadas. Las células tratadas y no tratadas para cada tipo celular mostraron patrones de proliferación casi idénticos en el tiempo.

Si dTAT perturba muchos endosomas durante la etapa de distribución, el tráfico endocítico sería hipotéticamente un proceso celular probable que estaría afectado negativamente después de la incubación peptídica. Por ejemplo, si dTAT altera la ruta endocítica dramáticamente distribuiría hipotéticamente una molécula con éxito después de un tratamiento inicial pero fallaría en la distribución de una segunda molécula con incubación de dTAT repetida. Para probar esta idea, se evaluó la distribución en etapas de dos moléculas diferentes (DEAC-K9 y SNAP-Surface® 488). Las células se incubaron primero con dTAT (5 µM) y DEAC-K9 (5 µM) durante 1 h. Como se esperaba, esta incubación dio por resultado la distribución citosólica tanto de dTAT como de DEAC-K9 (datos no mostrados). Veinte minutos más tarde, las células se incubaron con dTAT (5 µM) y SNAP-Surface® 488 (5 µM) durante 1 h. Sorprendentemente, las células tratadas con este protocolo de etapas múltiples presentaron fluorescencia citosólica y nuclear tanto de DEAC-K9 como de SNAP-Surface® 488 (Figura 13). De forma importante, la distribución de SNAP-Surface® 488 no se dio en ausencia de dTAT durante el protocolo de distribución de etapas múltiples. Brevemente, las células HeLa se incubaron primero con dTAT 5 µM y DEAC-K9 5 µM durante 1 h. Las células se lavaron después, se incubaron con SNAP-Surface® 488 5 µM durante 1 h y se captaron en imágenes. Las imágenes monocromas invertidas mostraron localización citosólica y nuclear de TMR y DEAC. Sin embargo, SNAP-Surface® 488 presentó una distribución punteada de fluorescencia (no mostrada). Además, la distribución de SNAP-Surface® 488 se inhibió por bafilomicina, coherente con la noción de que la segunda etapa de distribución está mediada también por la actividad endosomolítica de dTAT (Figura 13). Además, la fluorescencia de SNAP-Surface® 488 examinada fue comparable a la obtenida si SNAP-Surface® 488 se distribuyera en células no tratadas (distribución en una etapa) o simultáneamente con DEAC-K9 (FIGURAS 14A-14B). Juntos estos resultados establecen que la distribución mediada por dTAT puede repetirse. Esto, a su vez, establece que la ruta endocítica empleada por dTAT no está dramáticamente comprometida después del escape endosómico de dTAT.

dTAT no provoca una fuerte respuesta transcripcional en las células

Para determinar mejor el efecto de la exposición de dTAT en una célula, se realizó un análisis de micromatriz de genoma completo en células tratadas con dTAT 5 µM durante 1 h para determinar si los patrones transcripcionales están influidos. El análisis se realizó inmediatamente, 1 h o 24 h después del tratamiento con dTAT. La Figura 15 ilustra el gráfico que representa los valores de intensidad de la micromatriz de muestras tratadas frente a no tratadas (mismas etapas de incubación pero sin péptido). Las líneas rectas representan límites de cambio de intensidad de 2

veces. Estos datos ilustran que la exposición de dTAT provoca perturbaciones transcripcionales mínimas en una escala de genoma completo.

dTAT distribuye proteínas en el citosol y el núcleo de células vivas en trans.

dTAT, DEAC-K9 y SNAP-Surface® 488 son moléculas relativamente pequeñas. Por lo tanto se abordó si la fuga endosómica mediada por dTAT podría distribuir proteínas grandes en el citosol de las células. Para este ensayo, se eligió EGFP (26 kDa) como un modelo, ya que esta proteína es fluorescente solo cuando se pliega de forma apropiada. EGFP y dTAT se incubaron durante 1 h con las células y la distribución de proteína se examinó por fluorescencia. Como se observa con otras moléculas impermeables a la célula, EGFP se distribuyó en el citosol y el núcleo en más del 90% de las células sin toxicidad observable (en células HeLa o NIH 3T3; véase la Figura 16A y la Figura 17). Mientras la degradación de la proteína tuviera lugar durante la distribución, este ensayo establece que una población de proteína plegada se distribuye. Además, un ensayo de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) estableció que dTAT no se une a EGFP (Figuras 18A-18C). Estos resultados sugieren que las interacciones entre dTAT y una proteína no se necesitan para la distribución.

Para confirmar adicionalmente que las proteínas funcionales pueden penetrar en las células tras la incubación con dTAT, se probó la distribución de Cre recombinasa. En este ensayo, Cre induce la recombinación de una secuencia *loxP*-STOP-*loxP* corriente arriba del gen *egfp* de un plásmido reportero. Por lo tanto, las células transfectadas con el plásmido reportero expresan EGFP cuando la Cre recombinasa penetra en las células y escinde la secuencia de la señal STOP (véase, p.ej., Wadia, J.S., et al., "Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis", Nat Med 10:310-315 (2004), incorporado en esta memoria por referencia en su totalidad). Como se muestra en la Figura 16B, las células tratadas con TAT-Cre (1 μ M) y dTAT (5 μ M) expresaron EGFP. Además, el porcentaje de células EGFP⁺ fue mayor en la presencia de dTAT (47%) que en presencia de TAT o cuando TAT-Cre se incubó solo (<5%). Después, se examinó la distribución de FITC-anti-ATP5A, un anticuerpo etiquetado de forma fluorescente que reconoce la subunidad alfa de la ATP sintasa mitocondrial. Como se muestra en la Figura 16C, las células vivas tratadas con FITC-anti-ATP5A (20 μ g/mL) y dTAT (5 μ M) contenían estructuras tubulares fluorescentes verdes. La co-localización con el marcador mitocondrial fluorescente en azul pTagCFP-mito confirmó que estas estructuras son mitocondrias (Figura 19A). Finalmente, las células tratadas con FITC-anti-IgG, un anticuerpo que no se dirige a la mitocondria, no presentaron las mismas estructuras tubulares (Figura 19B). Juntos, estos experimentos confirman que dTAT puede distribuir un anticuerpo funcional en células vivas.

Después, se probó la distribución del factor de transcripción terapéuticamente importante HoxB4. HoxB4 puede penetrar en las células por sí mismo o cuando se condensa al PDT TAT y activar la transcripción. Por lo tanto, se determinó si dTAT, promoviendo la distribución citosólica, mejoraría la actividad transcripcional de la proteína. Las células NIH 3T3 se transfectaron con un vector que contenía el gen luciferasa bajo un promotor inducible por HoxB4 y con un reportero de β -galactosidasa como control interno. Las células se incubaron con HoxB4 o TAT-HoxB4, en ausencia o presencia de dTAT durante 1,5 h. Las células se lisaron después y la expresión de la luciferasa se evaluó midiendo la luminiscencia de lisatos celulares normalizados a la actividad de β -galactosidasa. La Figura 20A muestra que HoxB4 y TAT-HoxB4 (200 nM) solos indujeron un aumento de 2,2 y 5,0 veces, respectivamente, en actividad de luciferasa sobre la actividad obtenida de células que no se trataron con estas proteínas. Estos valores son coherentes con los informes publicados previamente. En contraste, la adición de dTAT (3 μ M), llevó a la inducción de la luciferasa de 53,1 y 307,4, respectivamente. La inducción de la luciferasa se aumentó por lo tanto 24 veces en presencia de dTAT por HoxB4 y 61 veces para TAT-HoxB4. Ni dTAT solo ni dTAT incubado con TAT-mCherry llevaron a la inducción de la luciferasa, indicando que la expresión de luciferasa es dependiente de la presencia de HoxB4. Aunque el aumento de rendimiento transcripcional de HoxB4 es valioso, altos niveles de expresión de HoxB4 pueden dar por resultado efectos anti-proliferativos y transformantes. Controlar de forma precisa el nivel y la actividad de HoxB4 dentro de las células es importante por lo tanto para alcanzar un resultado biológico deseable. Debido a que dTAT parece actuar independientemente de las moléculas usadas para la co-incubación en nuestros ensayos, se hipotetizó que sería posible valorar la cantidad de proteína que penetra en las células variando la concentración de proteína en el medio mientras se mantiene la concentración de dTAT constante. En este escenario, la eficiencia de escape endosómico permanecería sin afectar aunque la cantidad de material liberado desde los endosomas cambiaría. Los experimentos iniciales con DEAC-K9 mostraron que la cantidad de péptido fluorescente distribuido dentro de las células podrían valorarse usando este protocolo (Figura 20B). Coherente con estos resultados, la inducción de luciferasa respondió linealmente con la concentración de HoxB4 en el medio (Figura 20C). Juntos estos resultados muestran que la distribución mejorada lleva a la actividad biológica aumentada de proteínas administradas de forma extracelular y que la actividad de las moléculas distribuidas puede modularse de forma precisa.

La unión estructural entre cada monómero TAT en dTAT puede cambiarse sin afectar a la actividad de penetración en la célula

Para determinar la relevancia de la unión disulfuro que mantiene a dTAT en su forma dimérica, se construyó un constructo TAT dimérico alternativo. Específicamente, se construyó un constructo TAT dimérico donde el conector de unión disulfuro se sustituye con un conector no reducible (nrdTAT). La estructura y masa esperada de este constructo nrdTAT particular se ilustra en la Figura 21. La unión estructural entre cada monómero TAT en dTAT puede cambiarse sin afectar a la actividad de penetración en la célula. El constructo rdTAT se probó para la actividad de penetración celular general, como se describe en más detalle anteriormente. Las células HeLa se incubaron con nrdTAT 5 μ M y

10 μM durante 1 h. Las Figuras 22A y 22B ilustran las respectivas imágenes de campo brillante (paneles izquierdos), imágenes de fluorescencia monocroma (paneles centrales; blanco = señal de fluorescencia, negro = sin señal); y viabilidad celular con SYTOX Azul ($2 \mu\text{M}$) usado como un indicador de muerte celular (paneles derechos). Estos datos muestran la distribución citosólica eficiente de nrdTAT en células HeLa a ambas concentraciones sin afectar de forma negativa a la biología celular. Por consiguiente, el conector que une los péptidos TAT en un constructo dimérico no necesita ser un conector disulfuro, sino que puede cambiarse para incorporar funcionalidades diferentes mientras retienen la actividad de penetración en la célula descrita anteriormente.

Discusión

dTAT es notablemente eficiente en la distribución de proteínas, péptidos o pequeñas moléculas en el citosol o núcleo de células vivas. En particular, dTAT media la liberación de moléculas atrapadas dentro de los endosomas. La distribución es eficiente porque la cantidad de material que alcanza el citosol es sustancial, la cantidad de material que permanece atrapado dentro de los endosomas es relativamente bajo, y porque la distribución citosólica se da en la mayoría de células presentes en una muestra. El escape endosómico parece tener lugar en la mayoría de células una vez que dTAT alcanza una concentración umbral en los endosomas. De forma importante, acTAT no consigue el escape endosómico incluso cuando la cantidad de péptido monomérico internalizado está por encima del nivel umbral (Figura 23). Estos resultados sugieren por lo tanto que dTAT es intrínsecamente más endosomolítico que su homólogo monomérico.

Un aspecto notable de la distribución mediada por dTAT es la toxicidad sorprendentemente baja asociada con el eficiente escape endosómico observado. En contraste, la lisis endosómica inducida por luz se ha mostrado que es extremadamente tóxica provocando la rápida liberación de calcio en el citosol de las células. Efectos similares podrían esperarse por lo tanto de la actividad endosomolítica de dTAT. Además, el daño en la membrana que se esperaba que acompañara la fuga endosómica además de la liberación endosómica y lisosómica de proteasas podría contribuir a la toxicidad. Aún, a $5 \mu\text{M}$, una concentración a la que la distribución citosólica se observa en más del 95% de las células, dTAT sorprendentemente no afecta a la viabilidad celular. Además, la distribución mediada por dTAT no tiene un impacto negativo en la proliferación, indicando que las células no son solo viables sino que están también relativamente sanas. Además, estos efectos se observan para una variedad de distintos tipos de células, incluyendo células notoriamente resistentes a las técnicas de transfección estándar.

dTAT distribuye moléculas impermeables a la célula que presentan diversas estructuras y propiedades. DEAC-K9, como dTAT, está altamente positivamente cargada y el pl de Cre (9,4), y HoxB4 (9,8) no sugieren tampoco interacciones electrostáticas favorables con dTAT. EGFP, una proteína con un pl menor (6,2), no interactúa significativamente con dTAT *in vitro*. Por lo tanto es probable que dTAT no interactúe significativamente con las moléculas probadas fuera de la célula o en el lumen de los endosomas.

El formato de co-incubación usado en la presente memoria permite que varias cargas se incuben y se distribuyan de una vez. De forma alternativa, la distribución puede realizarse en sucesivas etapas. La distribución mediada por dTAT no necesita preparados de muestra complejos y, como se ejemplifica por la distribución de SNAP-surface 488 o FITC-anti-ATP5A, se ajusta de forma ideal para las aplicaciones de captación de imágenes. Además, la co-incubación también proporciona la oportunidad de variar la concentración de moléculas diana independientemente de la de dTAT. En estos ensayos, la concentración de dTAT, por ejemplo, se mantuvo constante (es decir, $5 \mu\text{M}$) para mantener una alta eficiencia de liberación endosómica en la mayoría de las células. Variando la concentración de DEAC-K9 o HoxB4 en el medio, la cantidad de material distribuido al citosol y el resultado biológico, respectivamente, podría valorarse a su vez. Aunque esta estrategia presumiblemente no es óptima para la distribución *in vivo* de compuestos biológicos, ofrece varias ventajas en el contexto de cultivos tisulares y manipulación *ex vivo* de células. La sobreexpresión continua de HoxB4 después de la distribución retroviral, además de promover la expansión de células madre hematopoyéticas, puede llevar también a la transformación dañina, reducir la proliferación o sensibilizar a las células para la apoptosis. Estos diferentes resultados son dependientes de la dosis de HoxB4. La distribución mediada por dTAT, permitiendo que los niveles y actividad de HoxB4 estén controlados de forma precisa, podría proporcionar una solución a este problema. Esto, junto con la falta de manipulación genética asociada con la estrategia basada en ADN, podría contribuir a hacer estrategias de terapia celular más seguras para los pacientes.

Ejemplos

50 Materiales y métodos

Diseño de péptidos, síntesis y purificación

Todos los péptidos se sintetizaron en el laboratorio en la resina de amida de rink de MBHA (Novabiochem, San Diego, CA) mediante SPPS usando protocolos Fmoc estándar. Se usaron Fmoc-Lys(Mtt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH y Fmoc-Cys(Trt)-OH (Novabiochem) para montar los péptidos. Las reacciones se llevaron a cabo en un recipiente SPPS a temperatura ambiente usando una corriente de N_2 seco para proporcionar agitación. La desprotección de Fmoc se realizó mediante la adición de piperidina en dimetilformamida (DMF) (Fisher, Waltham, MA) (20%, 10 mL) a la resina peptídica-Fmoc (0,30 mmoles). Las reacciones de desprotección se realizaron durante 1 x 5 min y 1 x 15 min con una etapa de lavado entre reacciones. Las reacciones

de acoplamiento de aminoácidos se realizaron durante 4 h con una mezcla de Fmoc-aminoácido (1,2 mmoles), HBTU (Novabiochem) (0,44 g, 1,1 mmoles) y diisopropiletilamina (DIEA) (Sigma, San Luis, MO) (0,51 mL, 3,0 mmoles) en DMF. Tras completarse las reacciones, la resina se lavó con DMF y diclorometano (DCM) (Fisher, Waltham, MA). Para DEAC-K9, el fluoróforo DEAC (AnaSpec, Fremont, CA) se acopló al extremo N del péptido después del acoplamiento del noveno Fmoc-Lys(Boc)-OH usando una mezcla de DEAC, HBTU y DIEA (4, 3,9 y 10 equiv con respecto al péptido) en DMF. La reacción se llevó a cabo toda la noche usando una corriente de N₂ seco para proporcionar agitación. Para CK(ε-NH-TMR)TAT (TAT), el grupo protector Mtt en el grupo ε-amino de Lys en CK(ε-NH-Mtt)TAT se escindió con ácido trifluoroacético al 2% (TFA) (Fisher) y triisopropilsilano al 2% (TIS) (Sigma) en DCM, y la resina se lavó con DCM y DMF. Una mezcla de TMR, HBTU y DIEA (4, 3,9 y 10 equiv con respecto al péptido) en DMF se añadió a la resina y la reacción se realizó toda la noche usando N₂ seco para proporcionar agitación. Después de la desprotección de Fmoc y el montaje peptídico, la resina se lavó con DCM y se secó al vacío. La resina se trató entonces con TFA que contenía 2,5% de H₂O, 2,5% de TIS y 2,5% de etanoditiol (EDT) (Sigma) durante 3 h a temperatura ambiente para alcanzar la desprotección global y la escisión de la resina. Los productos peptídicos en bruto se precipitaron y se lavaron con Et₂O anhidro frío (Fisher). Los precipitados se suspendieron de nuevo en agua y se liofilizaron. Los productos obtenidos se suspendieron de nuevo en 0,1% de TFA acuoso/acetonitrilo. Los péptidos se analizaron y se purificaron por HPLC en fase inversa. El análisis de HPLC se realizó en un instrumento Hewlett-Packard serie 1200 y una columna analítica Vydac C18 (5 µm, 4 x 150 mm). El caudal fue 1 mL/min, y la detección fue a 214 nm y 550 nm. Se realizó HPLC semi-preparativo en una columna Vydac C18 10 x 250 mm. El caudal fue 4 mL/min, y la detección fue a 214 nm y 550 nm. Todas las marchas usaron gradientes lineales de 0,1% de TFA acuoso (disolvente A) y 90% de acetonitrilo, 9,9% de agua y 0,1% de TFA (disolvente B). La identidad correcta de los péptidos se confirmó por MALDI-TOF realizado con un instrumento Shimadzu/Kratos (AXIMA-CFR, Shimadzu, Kyoto). TAT, masa esperada: 2039,16, masa observada: 2040,66. DEAC-K9, masa esperada: 1412,97, masa observada: 1415,59.

Síntesis de C(S-CH₂CONH₂)K(ε-NH-TMR)TAT acetamidado

Se formó C(S-CH₂CONH₂)K(ε-NH-TMR)TAT después de la adición de yodoacetamida (Sigma) (0,275 mg, 1,49 µmoles) a CK(ε-NH-TMR)TAT (148 µg, 0,074 µmoles) en HEPES 25 mM pH 7,5. La reacción se realizó en una atmósfera de N₂ y se monitorizó por HPLC analítico en fase inversa y MALDI-TOF. El producto se purificó usando HPLC analítico en fase inversa. Masa esperada: 2096,18, masa observada: 2096,31.

Generación de dTAT por dimerización de CK(TMR)TAT (TAT)

dTAT se formó disolviendo (0,3 mg, 1,5x10⁻⁴ mmoles) TAT en solución salina de tampón fosfato aireado (PBS) pH 7,4 (5 mL). El oxígeno disuelto en el tampón actúa para oxidar los grupos tiol en los péptidos y formar un enlace disulfuro. La reacción se dejó reaccionar toda la noche y se monitorizó por HPLC analítico en fase inversa y MALDI-TOF. El producto se purificó usando HPLC analítico en fase inversa. Masa esperada: 4076,30, masa observada: 4084,21.

Clonado, sobreexpresión y purificación de TAT-Cre, TAT-mCherry, HoxB4 y TAT-HoxB4

El plásmido pTriEx-HTNC que codifica la proteína TAT-NLS-Cre marcada con His (TAT-Cre) se compró en Addgene (Cambridge, MA). El gen TAT-Cre se clonó entonces en el vector pTXB1 y se transformó en células BL21 (DE3) de *E. coli* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). La proteína se expresó y se purificó como se describe en Peitz, M., et al., "Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: A tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:4489-4494 (2002), incorporada en la presente memoria por referencia en su totalidad. Brevemente, TAT-Cre se expresó con IPTG 1 mM a 37°C durante 3 h. TAT-Cre se purificó entonces hasta homogeneidad usando una resina Ni-NTA (Qiagen, Valencia, CA) y cromatografía de intercambio catiónico (HiTrap SP HP, GE Healthcare, Pittsburgh, PA). pTXB1-TAT-mCherry se obtuvo insertando la secuencia TAT ADN en el plásmido pTXB1-mCherry. Los oligonucleótidos con secuencias 5'-TAT GGG TCG TAA AAA ACG TCG TCA GCG TCG TCG TGG TCA-3' (SEQ ID NO:2) y 3'-ACC CAG CAT TTT TTG CAG CAG TCG CAG CAC CAG TAT-5' (SEQ ID NO:3) (IDT, Coralville, IA) que codifican la secuencia TAT, que contienen sitios *NdeI*, se templaron para generar ADNbc. El plásmido pTXB1-mCherry se cortó con *NdeI* (New England BioLabs, Ipswich, MA) y se ligaron con ADNbc TAT. El plásmido pTXB1-TAT-mCherry se transformó en células BL21 (DE3) y la expresión de proteína se indujo con IPTG 1 mM a 16°C durante 24 h. Las células se cosecharon y se suspendieron de nuevo en tampón de lisis que contenía Tris-Cl 20 mM (pH 7,5) y NaCl 200 mM. Después de la lisis celular por sonicación y centrifugado a alta velocidad a 15K RPM durante 1 h, la fracción soluble se aplicó a resina de quitina (New England BioLabs, Ipswich, MA) pre-equilibrada con tampón de lisis y se incubó toda la noche a 4°C (la proteína contiene una marca de purificación del dominio de unión íntima-quitina C-terminal). La resina se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón de lisis. La proteína se escindió de la resina incubando las perlas con 1 volumen de columna de tampón de escisión suplementada con ácido 2-mercaptoetanosulfónico 100 mM y durante 24 h a 4°C. La proteína se purificó adicionalmente usando cromatografía de intercambio catiónico. El vector pTAT-HA-HoxB4 se proporcionó generosamente por G. Sauvageau, Universidad de Montreal, Montreal, Quebec, Canadá. Se produjo His₍₆₎-HoxB4 clonando el gen HoxB4 en pET-28a. Brevemente, el ADNc HoxB4 se amplificó primero a partir de pTAT-HA-HOXB4 usando cebadores diseñados para introducir los sitios *NdeI* y *XhoI*, en los extremos 5' y 3', respectivamente (5'-GGC ATT CAT ATG GCT ATG AGT TCT TTT TTG ATC AAC TCA-3' (SEQ ID NO:4); 5'-GGT CAG TCT CGA GCT AGA GCG CGC GGG G-3') (SEQ ID NO:5) (IDT). El fragmento PCR se insertó entonces en los correspondientes sitios *NdeI* y *XhoI* del vector 6xHis-marca, pET-28a. La fidelidad del marco de lectura se confirmó por secuenciación. El

procedimiento para la purificación tanto de TAT-HoxB4 y HoxB4 es similar y se ha descrito anteriormente en Krosil, J, et al., "In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein", Nat Med 9:1428-1432 (2003), incorporado en la presente memoria por referencia en su totalidad. Brevemente, las células BL21 (DE3) se transformaron con pTAT-HaHoxB4 o pET28a-HoxB4 y se indujeron a 37°C durante 5 horas con IPTG 1 mM. Las células en gránulos se lisaron por sonicación en Tampón A (urea 8 M, HEPES 20 mM, NaCl 200 mM, pH 8,0). Los lisatos, que se obtuvieron por medio de centrifugación a alta velocidad (14K RMP, 30 minutos a 22°C), se ajustaron después a imidazol 10 mM y se incubaron con perlas de Ni-NTA agarosa durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las perlas de níquel se lavaron entonces con Tampón A que contenía imidazol 20 mM y 40 mM para eliminar la presencia de cualquier producto no específico y las proteínas unidas se eluyeron posteriormente con imidazol 100 mM y 250 mM en Tampón A. Los eluidos de ambas concentraciones de imidazol que contenían las proteínas de interés (es decir, TAT-HoxB4 o HoxB4) se cargaron en una columna HiTrap SP HP a 4°C en Tampón B (urea 4 M, HEPES 20 mM, NaCl 50 mM, pH 6,5) y se eluyeron en FPLC en una única etapa a 4°C con Tampón C (HEPES 20 mM, NaCl 1 M, pH 8,0). Ambas proteínas se desalaron inmediatamente diluyendo con HEPES 20 mM (pH 8,0) y se concentraron usando unidades de filtro centrífugo con 10K MWCO (EMD Millipore, Billerica, MA), se hicieron alícuotas y se congelaron rápidamente a -80°C. Las concentraciones de proteína se determinaron usando el ensayo de proteína de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA).

Distribución de péptidos dentro de células vivas

Las células vivas de diferentes líneas (HeLa, HaCat, NIH 3T3) se cultivaron en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) (Fisher) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) (Fisher) y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5%. Las células se sembraron entonces en placas de 8 pocillos de manera que las células fueron confluyentes al 80%-90% después de 48 h. Cada pocillo se lavó 3 veces con PBS y medio L-15 de Leibovitz que no contenía el aminoácido cisteína (L-15 no reductor, nrL-15). El medio (nrL-15) usado para la incubación carece de cisteína para evitar la reducción del enlace disulfuro de dTAT. Las células se incubaron entonces con diferentes concentraciones del acTAT, TAT o dTAT a 37°C durante 1 h. Las células se lavaron 3 veces con PBS y nrL-15 y se pusieron en un microscopio de epifluorescencia invertida (Modelo IX81, Olympus, Center Valley, PA) equipado con una etapa de calentamiento mantenido a 37°C. Las imágenes se recogieron usando una cámara EMCCD iluminada por detrás Rolera-MGI Plus (Qimaging, Surrey, BC, Canadá). Las imágenes se consiguieron usando la captación de imágenes de campo brillante y tres conjuntos de filtros de fluorescencia estándar: CFP (Ex = 436 ± 10 nm / Em = 480 ± 20 nm), RFP (Ex = 560 ± 20 nm / Em = 630 ± 35 nm) y FITC (Ex = 488 ± 10 nm / 520 ± 20 nm). Las intensidades de fluorescencia de diferentes células se midieron con el software SlideBook 4.2 (Olympus, Center Valley, PA) y la intensidad de fluorescencia promedio se determinó para cada condición. Se ha presentado anteriormente que CPPs etiquetados con fluoróforos tales como TMR pueden fotosensibilizar membranas y provocar la fuga endosómica tras la irradiación de luz. Véase, Srinivasan, D. et al., "Conjugation to the cell-penetrating peptide TAT potentiates the photodynamic effect of carboxytetramethylrhodamine", PloS one 6:e17732 (2011) y Muthukrishnan, N., et al., "Synergy Between Cell-Penetrating Peptides and Singlet Oxygen Generators Leads to Efficient Photolysis of Membranes", Photochemistry and Photobiology 89:625-630 (2012), cada una incorporada en la presente memoria por referencia en su totalidad. La exposición a la luz de dTAT atrapado dentro de los endosomas (p.ej., después de la incubación a 2 µM) puede provocar también fuga endosómica (no mostrado). Sin embargo, varias evidencias indican que la luz no juega un papel significativo en la actividad de dTAT presentada en la presente memoria. Primero, todos los experimentos de distribución se realizaron en condiciones de radiación de luz mínima (habitación oscura con luz roja suave). Cuando se necesita la captación de imágenes de fluorescencia, se captan imágenes de sondas (p.ej., SNAP Surface 488, EGFP) antes que de dTAT lo sea, minimizando así el posible efecto de la luz en la liberación endosómica. Para experimentos realizados con Cre y Hoxb4, las células no se captan en imágenes y no se exponen a la luz (en absoluto para Hoxb4, 12 h después de la incubación para Cre). Además, la dosis de luz necesaria para observar fuga endosómica inducida por luz es típicamente de 10 a 20 veces mayor que la usada para la captación de imágenes.

Distribución de moléculas pequeñas, péptidos y proteínas dentro de células vivas por co-incubación con dTAT

Se sembraron células HeLa en placas de 8 pocillos, se cultivaron y se lavaron como se describe en la sección anterior. Las células se co-incubaron después con péptido de distribución 5 µM y con la carga a la concentración correspondiente durante 1 h a 37°C. Las células se lavaron 3 veces con PBS y nrL-15 y se pusieron en el microscopio. Se obtuvieron imágenes como se describe anteriormente. Para la transfección y expresión de SNAP-H2B y TagCFP-mito, se mezclaron plásmidos con reactivo Lipofectamine™ 2000 en medio opti-MEM y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. El complejo de ADN se añadió a células HeLa sembradas anteriormente (confluyentes al 80%) en una placa de 8 pocillos y las células se mantuvieron a 37°C durante 24 h. Después de 24 h, los pocillos se lavaron 3 veces con PBS y nrL-15 antes de realizar los experimentos de distribución usando SNAP-Surface® 488 o FITC-anti-ATP5A.

Determinación cuantitativa de absorción peptídica dentro de las células

Se sembraron células HeLa en una placa de 48 pocillos, se cultivaron y se lavaron como se describe anteriormente. Para el experimento de absorción peptídica, cada pocillo se incubó durante 1 h con concentración variable de acTAT, TAT o dTAT (intervalo: concentración de péptido de 5-25 µM). Para el experimento de valoración, las células se incubaron con dTAT (5 µM) y concentraciones variables de DEAC-K9 (intervalo: 1-20 µM). Las células se lavaron entonces con PBS y nrL-15 y se captaron en imágenes. Se obtuvieron múltiples imágenes para cada condición y se

procesaron. Para lisar células, se eliminó el nrL-15 de los pocillos y un total de 100 μ L de tampón de lisis de células HeLa (Tris 50 mM pH 7,5, EDTA 2 mM, DTT 2 mM, Tritón X-100 al 0,1%) se incubó con células durante 5 min. Las células se lisaron y se rasparon de la placa y se pipetearon en un tubo microcentrífugo de 1,5 mL. Los lisatos celulares se centrifugaron a 13,2K RPM durante 25 min. Para el experimento de absorción, se recogieron 70 μ L de los sobrenadantes de cada condición y se pusieron en una placa de 96 pocillos. La fluorescencia de los lisatos celulares se midió usando un lector de placas equipado con un módulo de fluorescencia (Ex = 525, Em = 580-640 nm) (GloMax®-Multi+ Detection System, Promega, Fitchburg, WI). Para el experimento de valoración, 80 μ L de sobrenadante se diluyó a un volumen total de 100 μ L y la fluorescencia total se midió usando un fluorómetro SLM-8000C (Ex = 435 nm, Em = 465-475 nm) (SLM Instruments, Bath, RU). La emisión de fluorescencia se promedió y se grabó. El dato se normalizó a la concentración total de proteína en cada pocillo usando el Ensayo de proteína Bradford. Usando una placa de 96 pocillos, se añadieron 10 μ L de cada lisato celular a 200 μ L de un reactivo de ensayo de proteína 1x y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. La absorbancia a 600 nm se midió usando el lector de placa. Las medidas se repitieron por triplicado.

Análisis cuantitativo de distribución de TAT-HoxB4 y HoxB4 con TAT y dTAT usando un reportero de luciferasa

La línea celular de fibroblastos murinos (NIH-3T3, transfectada de forma estable con el vector *E2A-PBX*), el vector reportero de luciferasa, *pML* (*5xHOX/PBX*; contiene un promotor con sitios de unión para HOXB4 y PBX) y el vector de control interno β -gal usado en los siguientes estudios se proporcionaron amablemente por P. Zandstra (Universidad de Toronto, Ontario, Canadá). Las células se cultivaron inicialmente en placas de 100 mm a 37°C con CO₂ al 5% en DMEM suplementado con FBS al 10%. Por propósitos experimentales, sin embargo, se sembraron células en placas de 24 pocillos a una densidad de $5\text{-}6 \times 10^4$ células/pocillo durante 24 horas. Posteriormente, las células se co-transfectaron con 0,8 μ g/mL de *pML* (*5xHOX/PBX*) y del vector de control interno β -gal usando Lipofectamine 2000. Doce horas después de la transfección, las células se lavaron y se incubaron con TAT-HoxB4 o HoxB4 (ambos a 200 nM, a menos que se anote otra cosa; véase a continuación) con o sin TAT o dTAT en nrL-15 durante 90 min. Algunas células se incubaron también con TAT-mCherry (200 nM) con o sin los péptidos. Después de la incubación, todas las células se lavaron con PBS y se lisaron según el protocolo del fabricante para el tampón de lisis reportero (RLB) (Promega). Para los experimentos de valoración, se siguió el mismo protocolo, con la excepción de que las concentraciones de HoxB4 se variaron (25, 50, 100, 150 y 200 nM). Para cuantificar la actividad del reportero de luciferasa, se añadieron 100 μ L de reactivo de ensayo de luciferasa (Promega) a 20 μ L de lisato celular y la bioluminiscencia se midió inmediatamente usando un luminómetro SpectraMaxL (Sunnyvale, CA). Para los propósitos de medida de la eficiencia de transfección, se mezclaron 180 μ L de tampón de ensayo β -gal con 20 μ L de lisato celular en una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37°C durante 30 min. El tampón de ensayo β -gal está comprendido por 75% de fosfato sódico 0,1 M, pH 7,5, 24% de o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG hecho a una concentración de 4 mg/mL en fosfato sódico 0,1 M) (Sigma) y 1% de disolución 100 veces (10% de disolución de cloruro de magnesio 1 M, 32% de β -mercaptoetanol y 58% de agua destilada). Se midió entonces la absorbancia a 450 nm usando el lector de placa. Como el espectro de absorción del cromóforo (TMR) conjugado con el péptido usado en este estudio solapa con el de β -gal, 20 μ L de lisato celular que contenía el péptido se diluyeron también con 180 μ L del tampón de lisis y los valores de absorbancia obtenidos a 450 nm se restaron de aquellos de los valores de absorbancia de β -gal. La actividad de luciferasa de todas las muestras se determinó como una relación de la actividad de luciferasa a la actividad de β -gal y el aumento en la actividad de luciferasa se estableció normalizando la actividad de luciferasa de cada muestra a la de las células, que se transfectaron, pero no habían distribuido proteína.

Ensayos de viabilidad celular

Para determinar las células que tenían comprometidas las membranas plasmáticas, las células se trataron con SYTOX® Verde (SYTOX® Azul en algunos casos) y Hoechst (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los tintes SYTOX® son impermeables a la célula y tiñen el ADN de las células con membranas plasmáticas comprometidas. El tinte Hoechst es permeable a la célula y tiñe el ADN de todas las células. Se obtuvieron imágenes usando el filtro verde y azul. Las imágenes verdes y azules se usaron para contar células con un núcleo teñido de azul o verde. La imagen J se usó para contar las células muertas (verde) y totales (azul). La citotoxicidad se determinó a partir de la relación de células positivas en SYTOX® verde/número total de células. Un ensayo MTT se realizó para determinar el efecto del péptido en la proliferación celular. Las células se sembraron en una placa de 6 pocillos, se cultivaron y se lavaron como se describe anteriormente. Un pocillo de la placa se incubó con dTAT 5 μ M a 37°C durante 1 h. Un segundo pocillo se dejó sin tratar y sirvió como control. Las células se lavaron 3 veces con PBS y nrL-15. Las células se tripsinizaron y se sembraron en placas de 96 pocillos que contenían 200 μ L de DMEM. Las células se dejaron entonces unirse al fondo de la placa durante 12 h. El ensayo MTT se realizó después a puntos temporales específicos para medir la proliferación celular. El DMEM se quitó, se sustituyó con 100 μ L de nrL-15, y se añadieron 10 μ L de una disolución estándar de MTT 12 mM a los pocillos. La placa de 96 pocillos se incubó a 37°C durante 4 h. Después de la incubación, 100 μ L de una disolución SDS-HCl 10 mM se añadió a cada pocillo. La disolución se mezcló completamente pipeteando arriba y abajo y se incubó durante 13 h. Después de la incubación cada muestra se mezcló y se midió la absorbancia a 600 nm. Los controles incluyeron un control negativo donde se añadieron 10 μ L de MTT a 100 μ L de nrL-15 solo (sin células). Un segundo control consistió en células tratadas con el péptido de distribución pero al que no se añadió MTT para restar la contribución de TMR de la absorbancia medida. La absorbancia del control negativo se restó de todas las muestras.

Determinación de las interacciones de dTAT y la carga

5 Los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron usando un fluorómetro SLM-8000C actualizado con el paquete fénix (ISS, Champaign, IL) y el software Vinci v.1.6 PC (ISS). Los experimentos se realizaron usando una cubeta de cuarzo a temperatura ambiente. Las muestras se excitaron a 488 nm (anchura de la hendidura = 1 mm) y la emisión de fluorescencia se barrió de 500 a 650 nm (anchura de la hendidura = 1 mm). Todas las muestras (EGFP (1 μ M) y dTAT (5 μ M)) se prepararon usando nrL-15.

Aunque las realizaciones ilustrativas se han ilustrado y descrito, se apreciará que pueden hacerse diversos cambios sin apartarse del espíritu y alcance de la descripción.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA DISTRIBUCIÓN DE MOLÉCULAS EN CÉLULAS VIVAS

5 <130> TAMUS-1-52684

<140> PCT/US14/
<141> 10-09-2014

10 <150> 61/876,006
<151> 10-09-2013

<160> 4

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 9

20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

25 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> Donde Xaa en las posiciones 1, 4, 5 y 7-9 es Arg, "R" o cualquier resto aminoacídico no natural con el grupo guanidinio

30 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (4)..(5)
<223> Donde Xaa en las posiciones 1, 4, 5 y 7-9 es Arg, "R" o cualquier resto aminoacídico no natural con el grupo guanidinio

35 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (7)..(9)
<223> Donde Xaa en las posiciones 1, 4, 5 y 7-9 es Arg, "R" o cualquier resto aminoacídico no natural con el grupo guanidinio

40 <400> 1
Xaa Lys Lys Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Xaa
1 5

45 <210> 2
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Sintética

55 <400> 2
tatgggtcgt aaaaaacgtc gtcagcgtcg tcgtggtca 39

<210> 3
<211> 39

60 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 794 599 T3

<220>

<223> Sintética

<400> 3

5 acccagcatt tttgcagca gtcgcagcag caccagtat 39

<210> 4

<211> 39

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

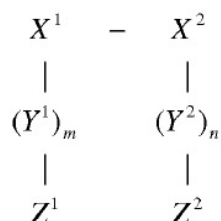
<223> Sintética

<400> 4

15 ggcatlcata tggctatgag ttcttttttg atcaactca 39

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula:



5 En donde

X es un resto de unión,

Y es un residuo de aminoácido acoplado de forma covalente a un resto hidrófobo,

Z es un resto de péptido de penetración celular (CPP), en donde el resto CPP tiene una carga positiva neta y tiene una secuencia de aminoácidos con 50% o más de los residuos que tienen un grupo guanidinio, y

10 m y n son independientemente 0 o 1, en donde

(i) al menos uno de m y n es 1 y el residuo de aminoácido es lisina (K), o

(ii) m y n son 0, y Z^1 y/o Z^2 es un CPP que comprende un residuo lisina (K) lo más en el extremo N unido a un resto hidrófobo.

15 2. El compuesto según la reivindicación 1, en donde el resto CPP comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 85% de identidad a la secuencia descrita en SEQ ID NO:1.

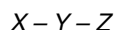
3. El compuesto según la reivindicación 1, en donde el resto hidrófobo comprende un grupo de cadena lineal, ramificado o cíclico C_6 - C_{30} , opcionalmente en donde el grupo cíclico es mono-, bi- o tricíclico.

4. El compuesto según la reivindicación 3, en donde el resto hidrófobo comprende un grupo rodamina, opcionalmente tetrametilrodamina (TMR).

20 5. El compuesto según la reivindicación 1, en donde tanto m como n son 1, y en donde el residuo de aminoácido es lisina (K).

6. El compuesto según la reivindicación 1, en donde X^1 y X^2 son residuos de cisteína (C) unidos por un enlace disulfuro.

7. Un compuesto que tiene la fórmula:



25 En donde

X es una cisteína (C),

Y es un residuo de aminoácido acoplado de forma covalente a un resto hidrófobo,

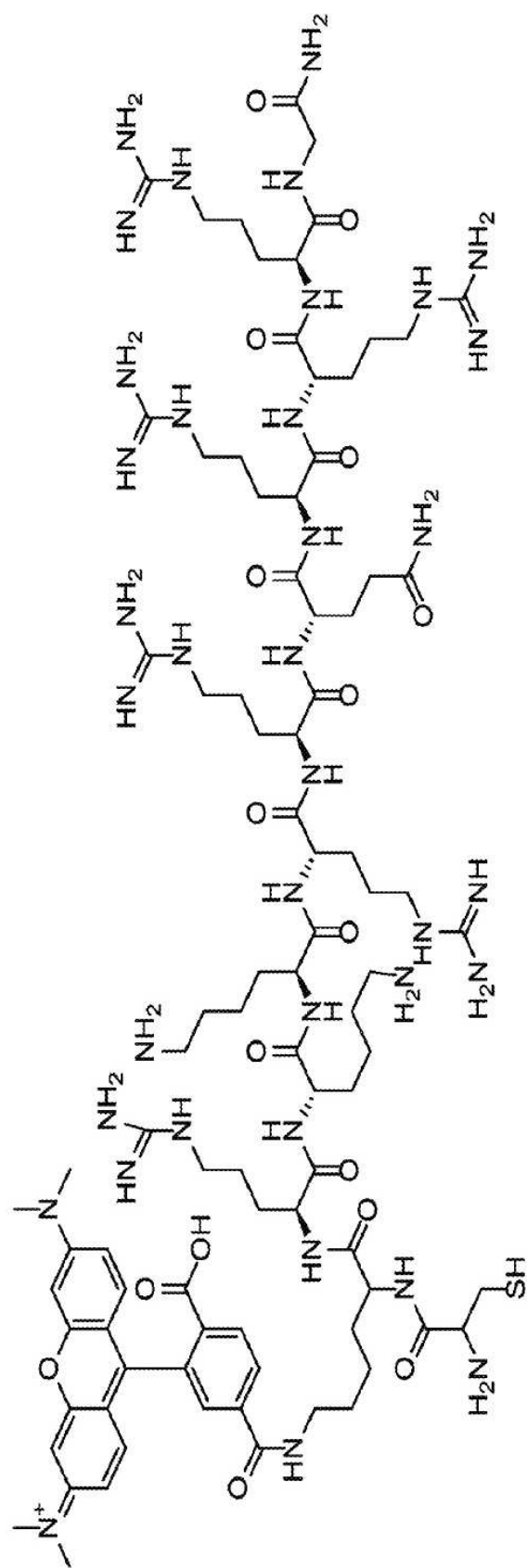
30 Z es un resto de péptido de penetración celular (CPP), en donde el resto CPP comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 85% de identidad a la secuencia descrita en SEQ ID NO:1, y en donde el resto CPP tiene una carga positiva neta y tiene una secuencia de aminoácidos con el 50% o más de los residuos que tienen un grupo guanidinio, y

X e Y, e Y y Z están unidos por enlaces amida.

8. El compuesto según la reivindicación 7, en donde el resto hidrófobo comprende un grupo rodamina.

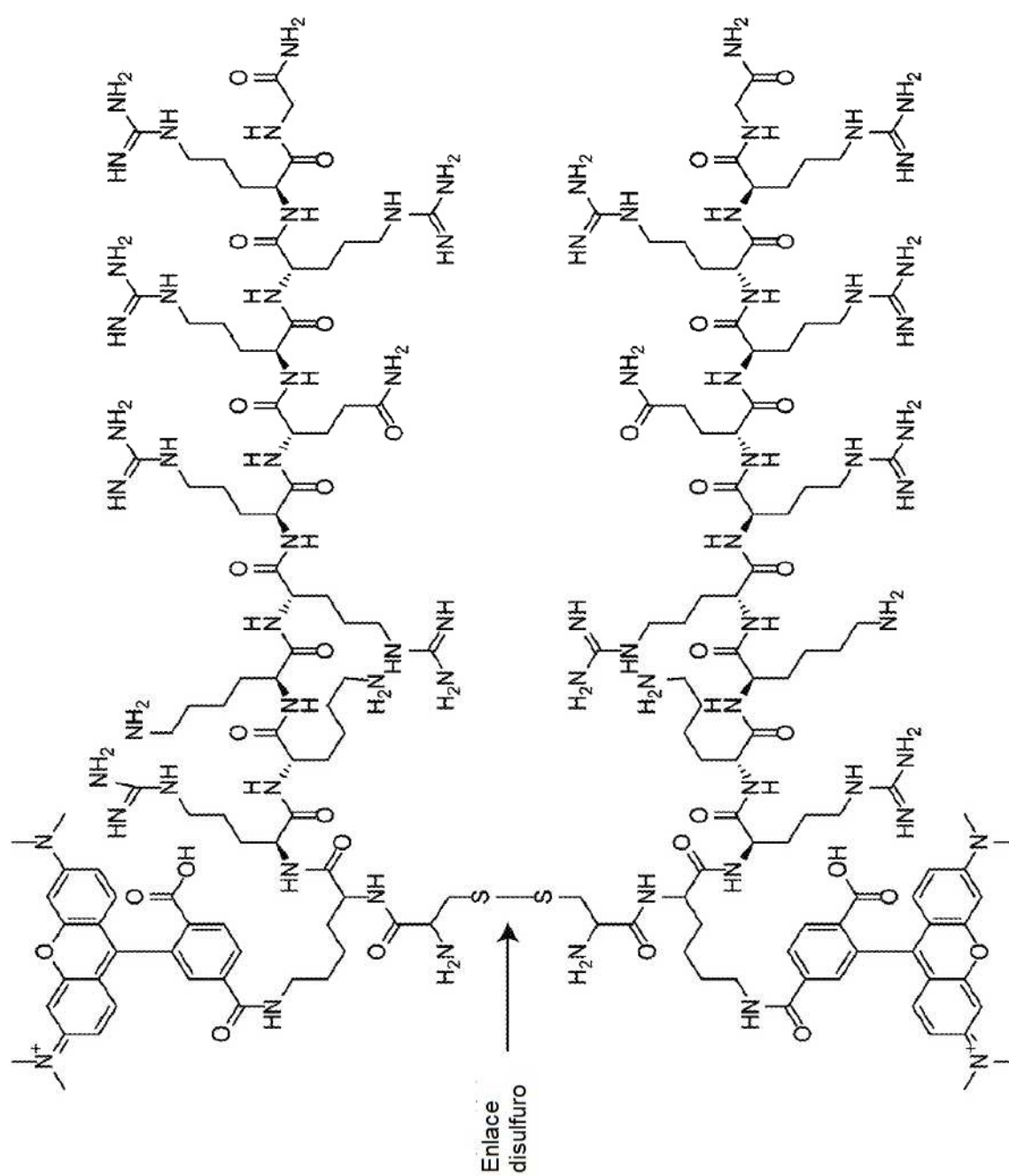
35 9. El compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 7 para usar como un medicamento en la mejora de la permeabilidad endosómica en una célula, que comprende poner en contacto una célula con el compuesto de la reivindicación 1 o reivindicación 7.

10. El compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 7 para usar según la reivindicación 9, que comprende además poner en contacto la célula con una molécula impermeable a la célula.
- 5 11. El compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 7 para usar como un medicamento en la distribución de una molécula impermeable a la célula al citosol de una célula, que comprende poner en contacto una célula con un compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 7 y una molécula impermeable a la célula bajo condiciones suficientes para permitir la endocitosis, en donde la molécula impermeable a la célula es un péptido, un polímero, opcionalmente un polipéptido o ácido nucleico, o un compuesto farmacéutico de molécula pequeña.
- 10 12. Un método de inducción de pluripotencia en una célula *ex vivo*, comprendiendo el método poner en contacto una célula obtenida de un sujeto con el compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 7 y un factor de transcripción bajo condiciones suficientes para permitir la endocitosis, y cultivar la célula para obtener la pluripotencia de la célula.
13. Un método de expansión de una célula madre *ex vivo*, comprendiendo el método poner en contacto una célula madre con el compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 7 y un factor de transcripción bajo condiciones suficientes para permitir la endocitosis, y cultivar la célula para obtener la expansión de la célula.

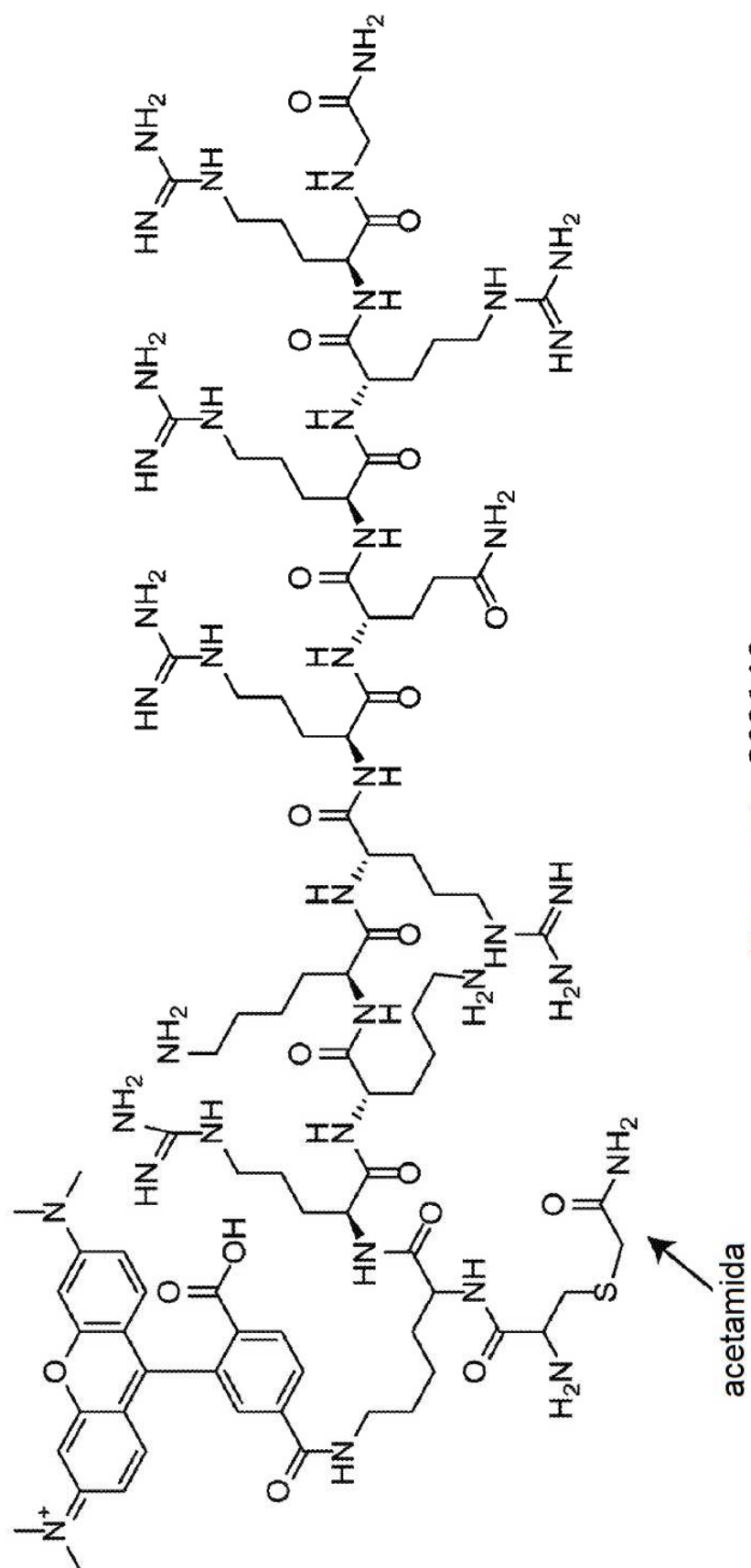


Masa exacta: 2039,16

FIG. 1

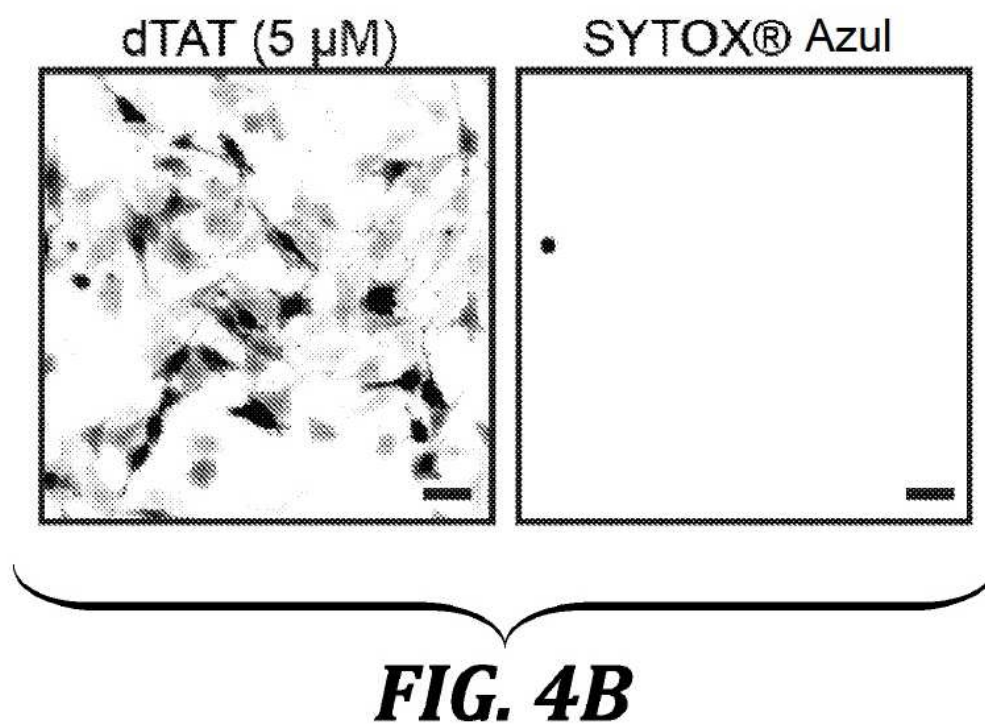
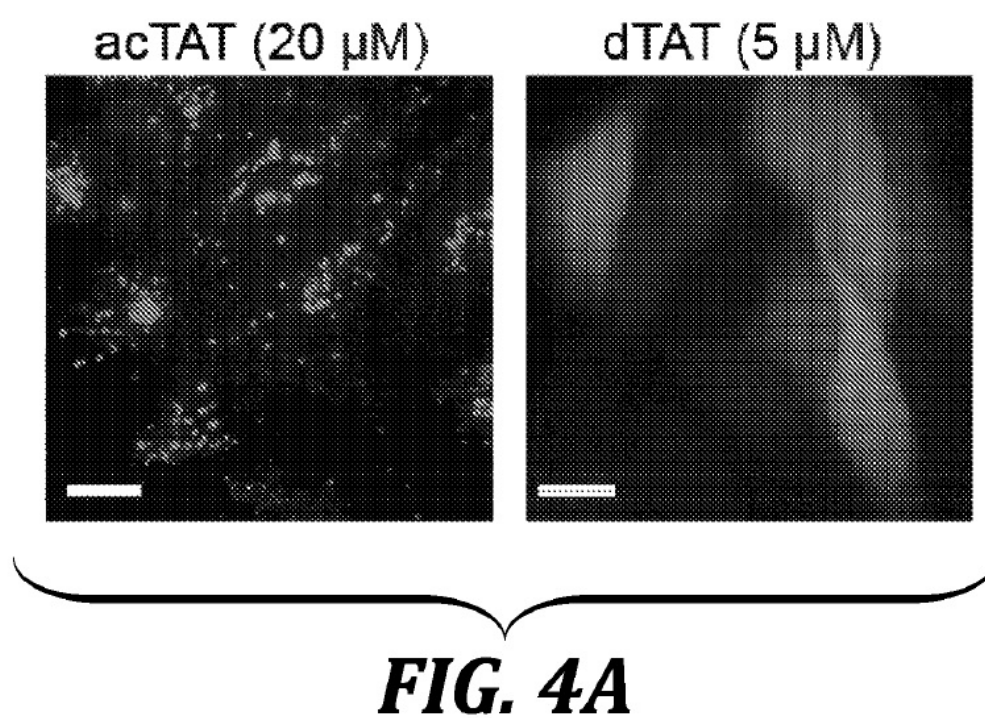
FIG. 2

Masa exacta: 4076,30



Masa exacta: 2096,18

FIG. 3



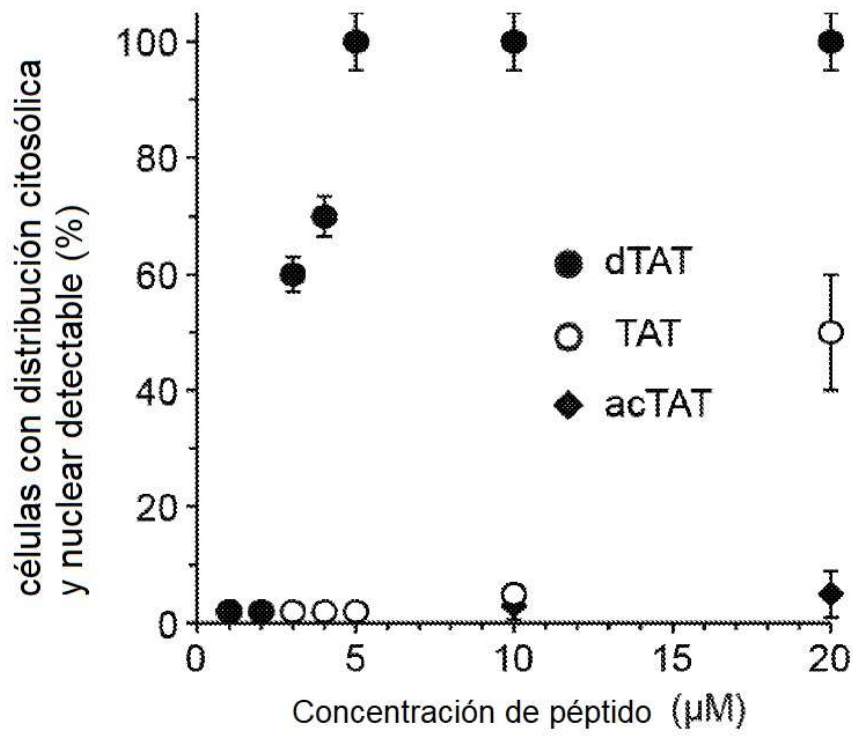


FIG. 4C

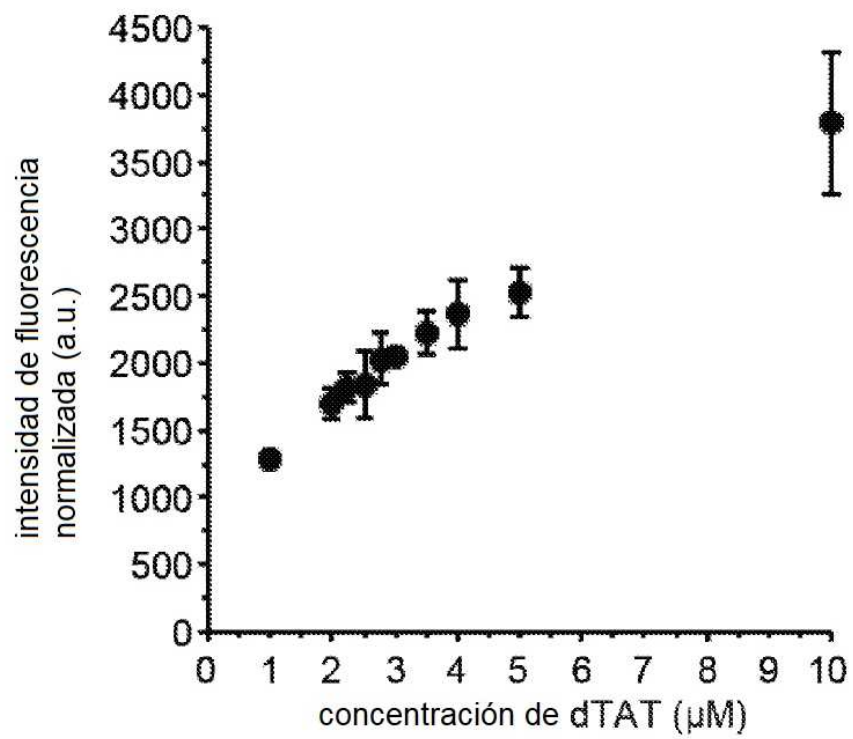


FIG. 4D

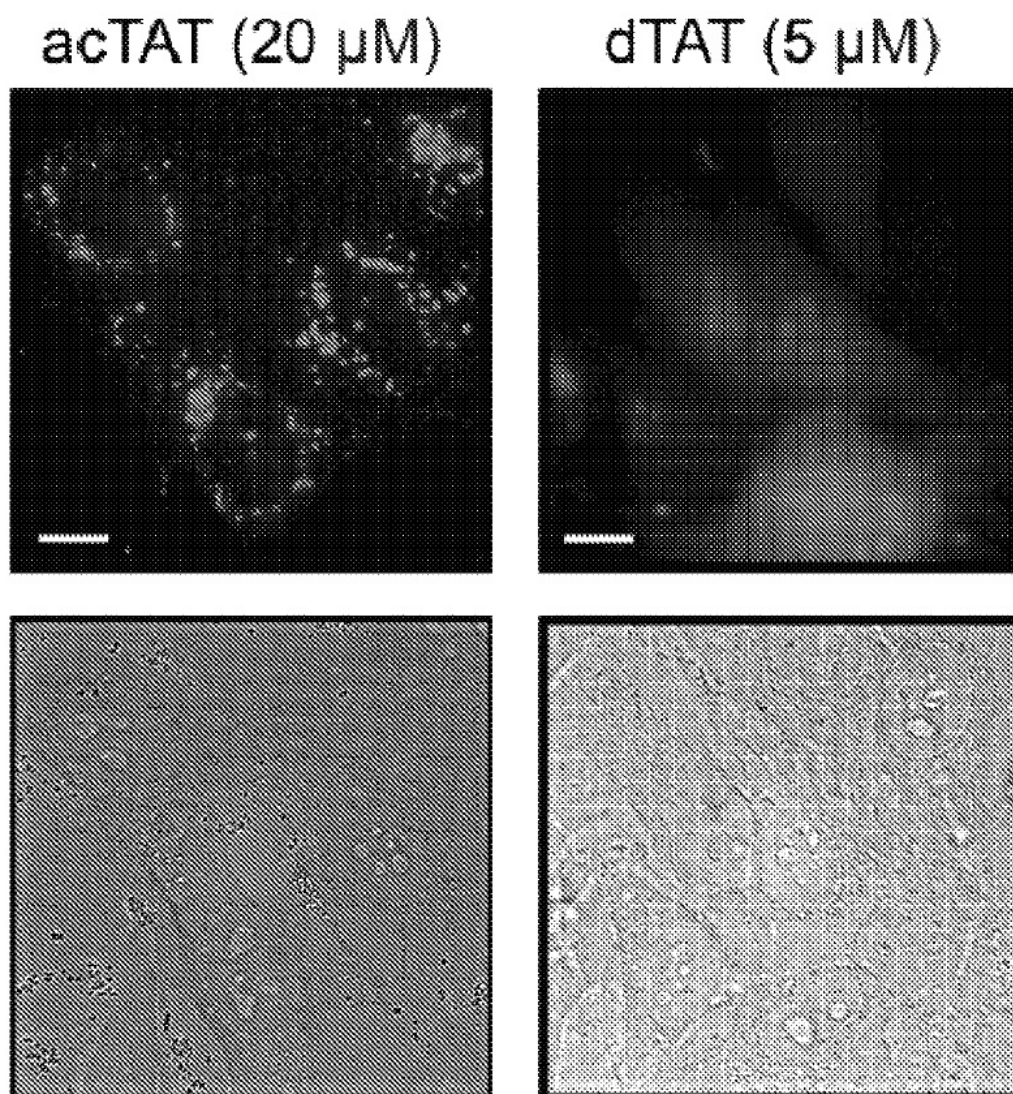


FIG. 5

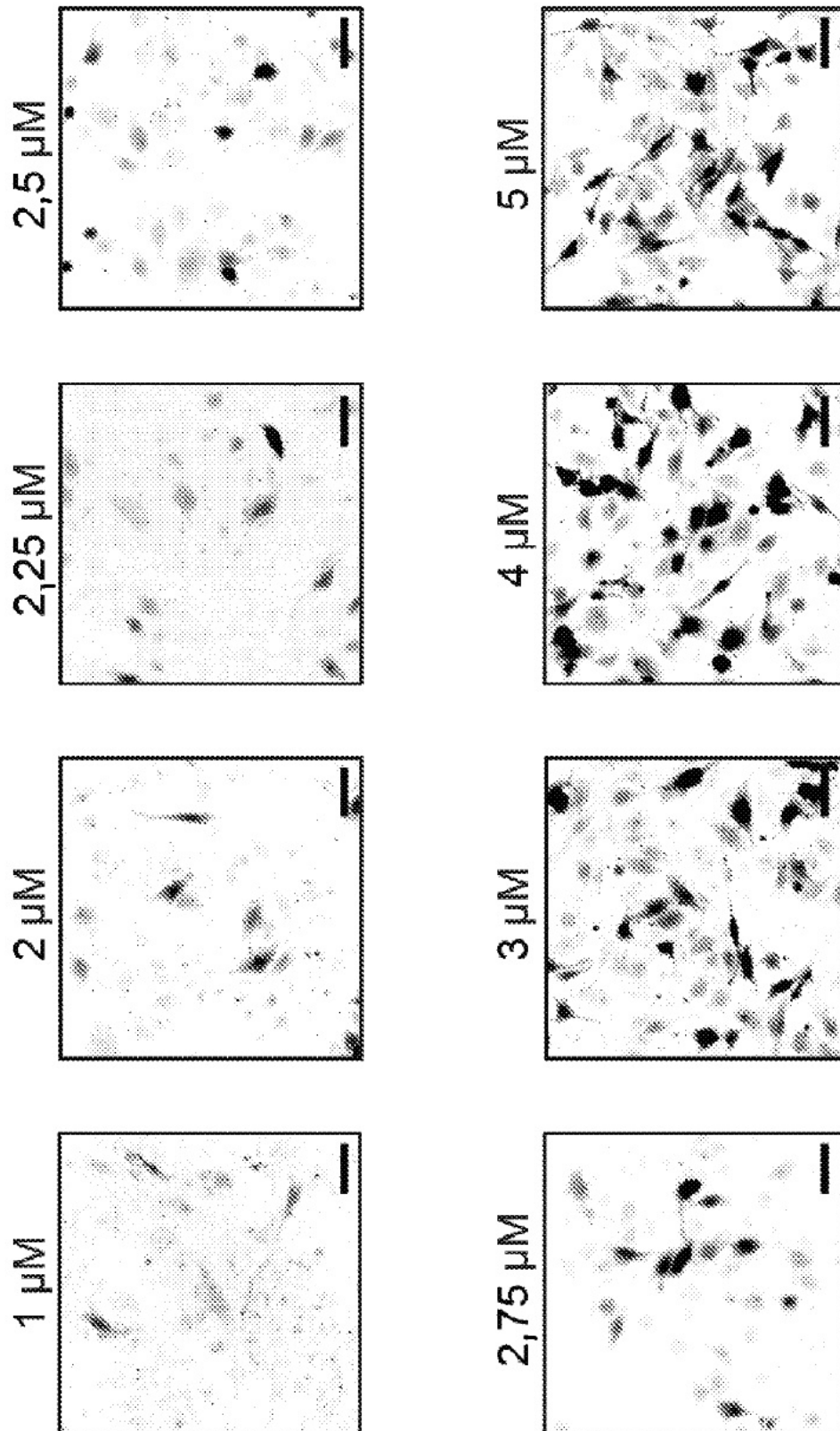


FIG. 6

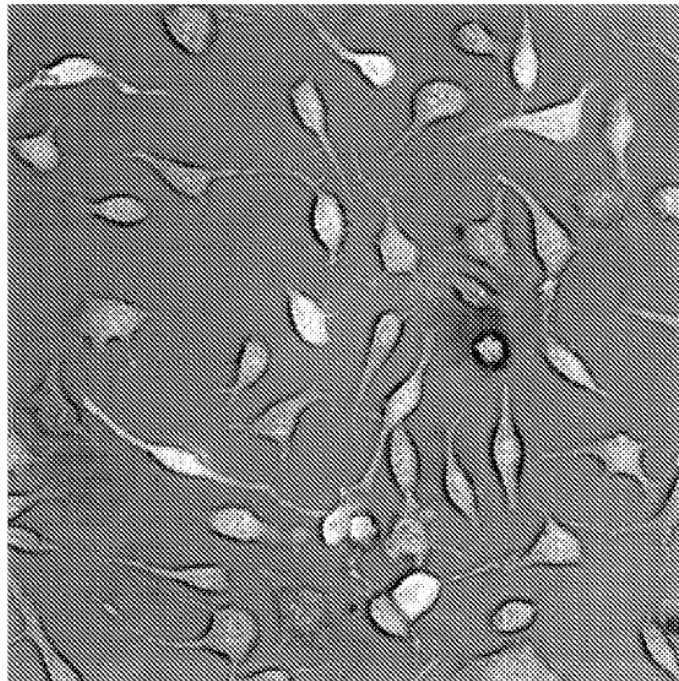


FIG. 7A

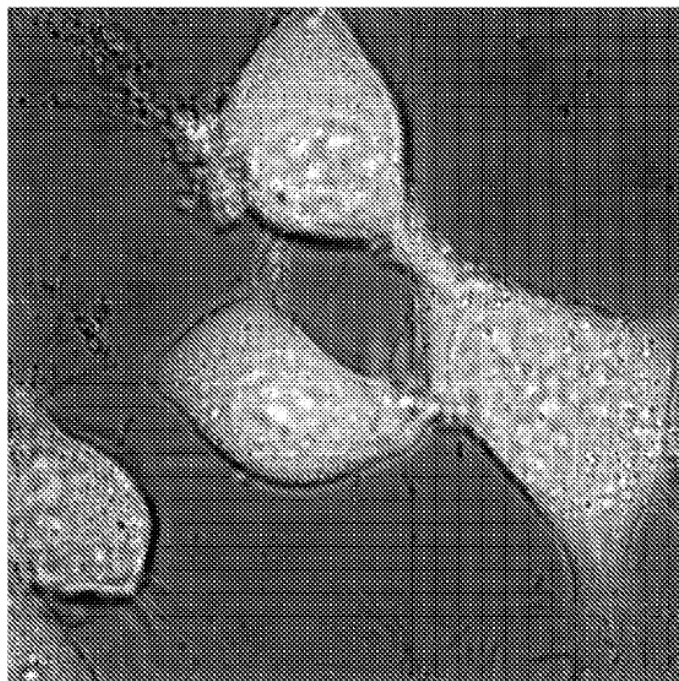


FIG. 7B

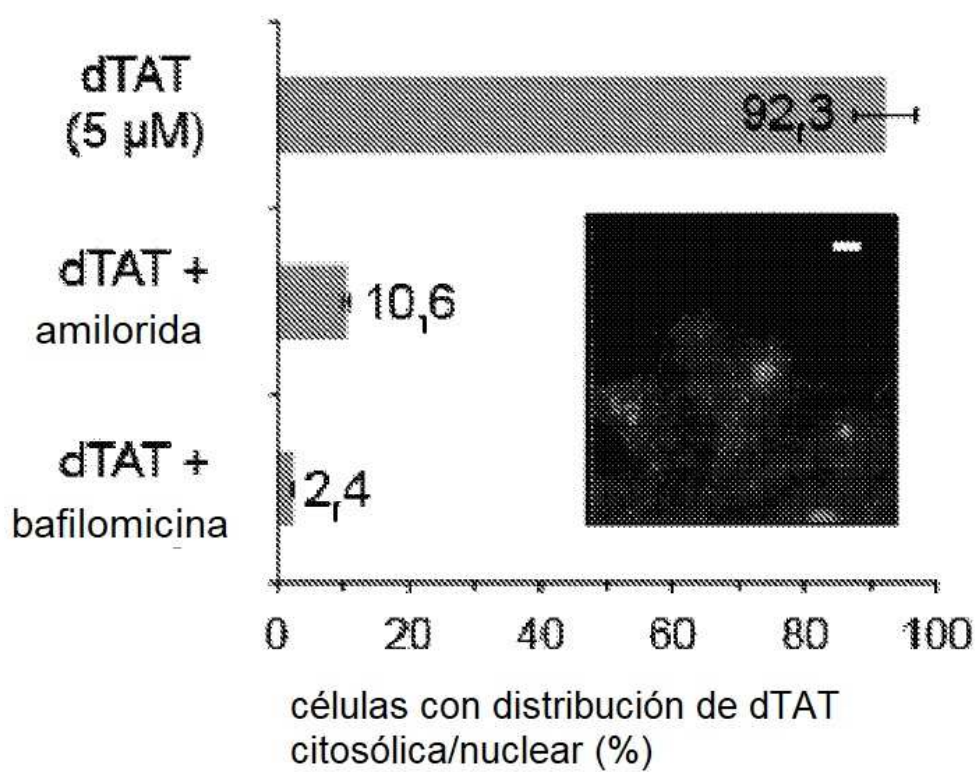


FIG. 8A

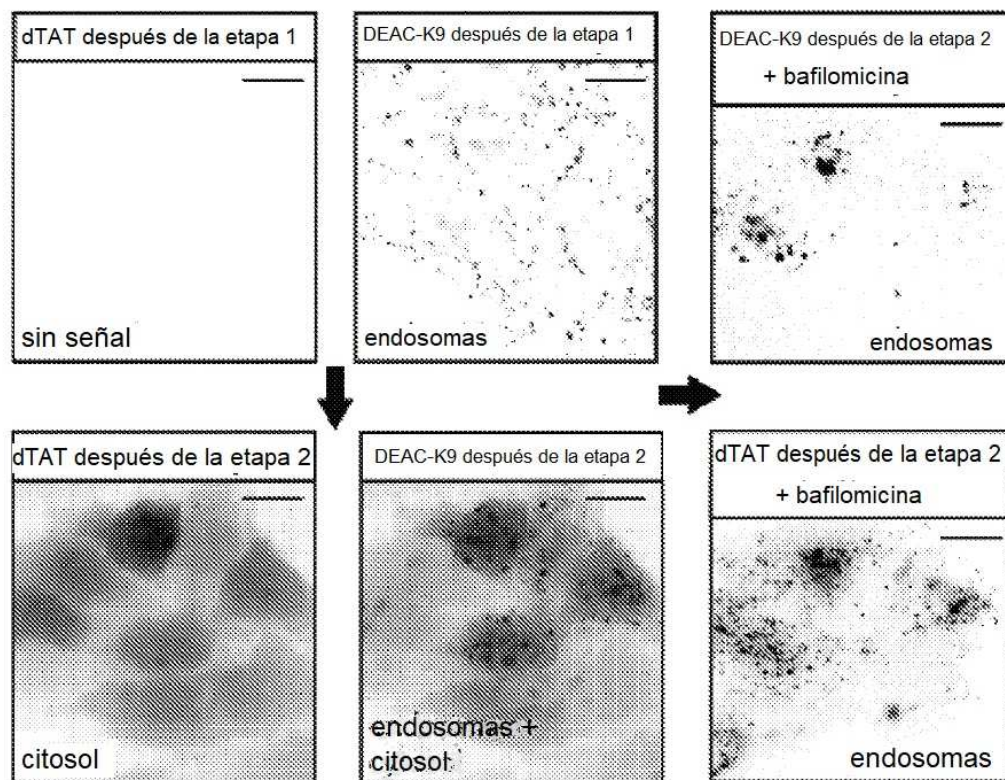
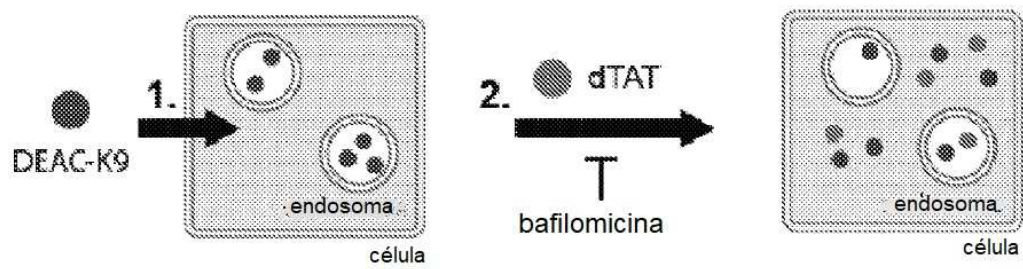


FIG. 8B

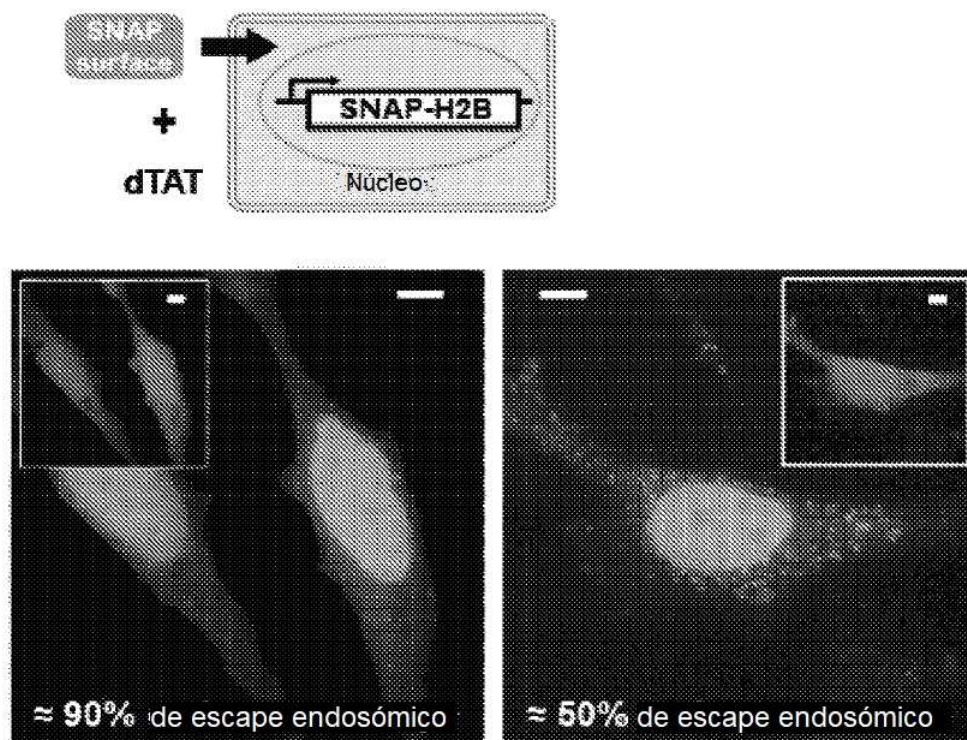
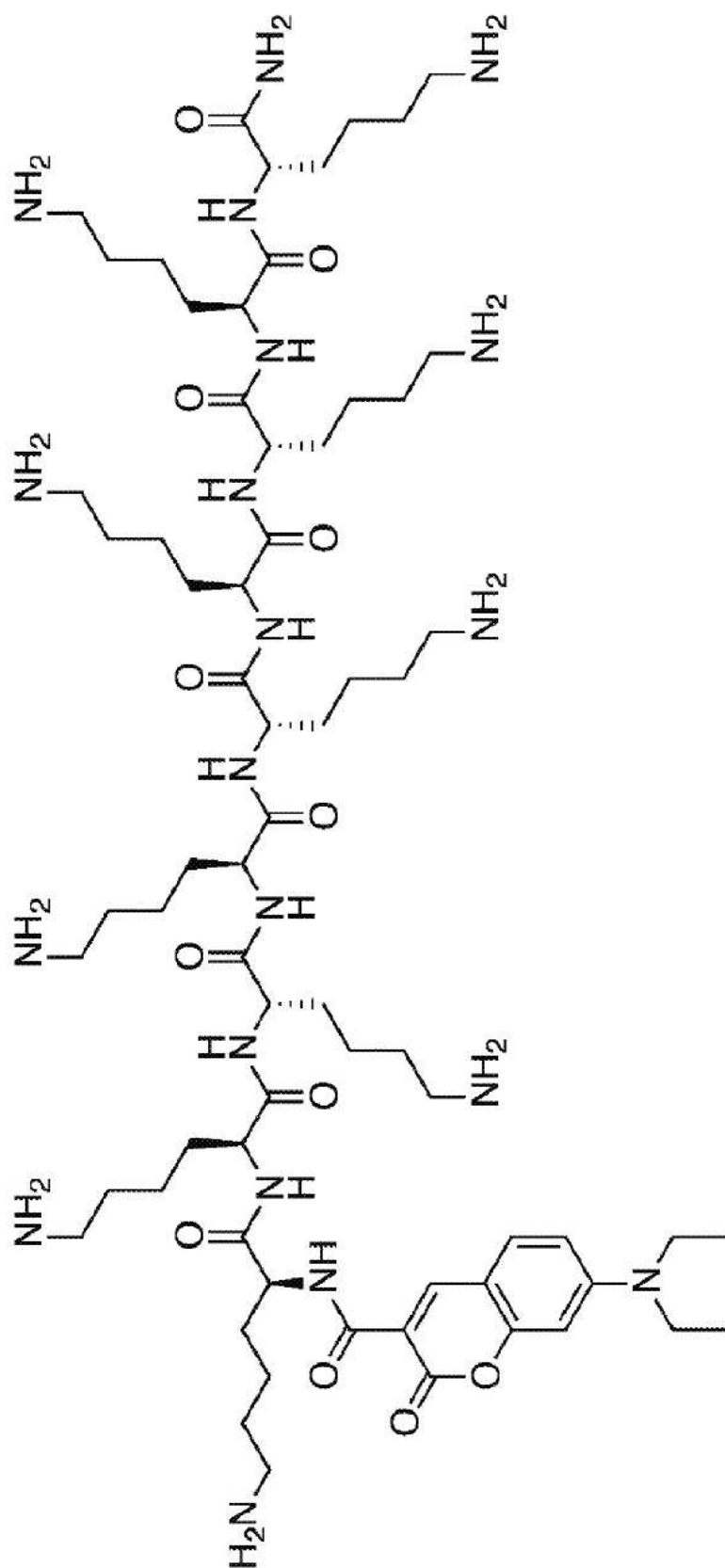


FIG. 8C



Masa exacta: 1412,17

FIG. 9

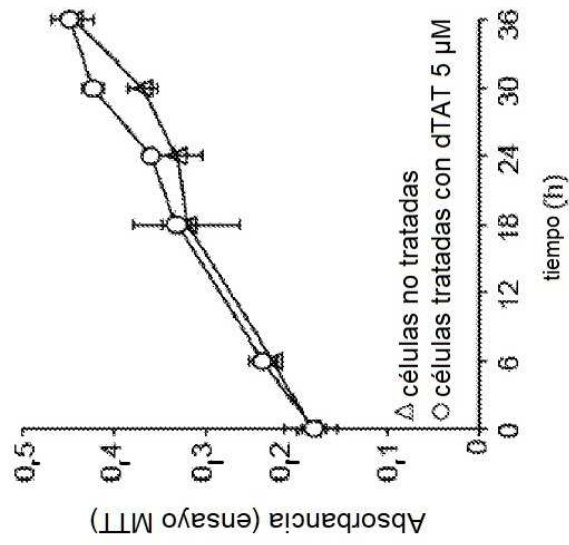


FIG. 10C

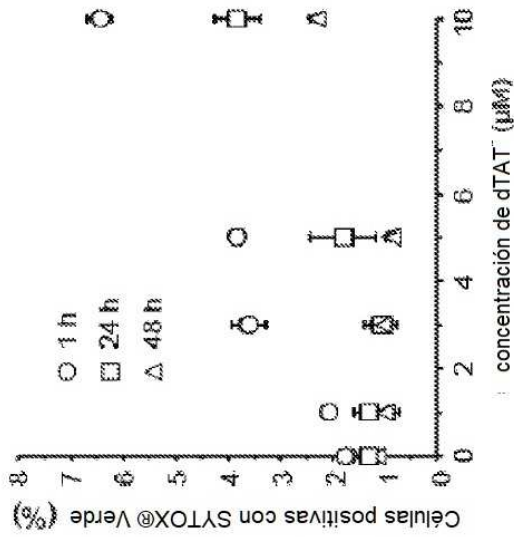


FIG. 10B

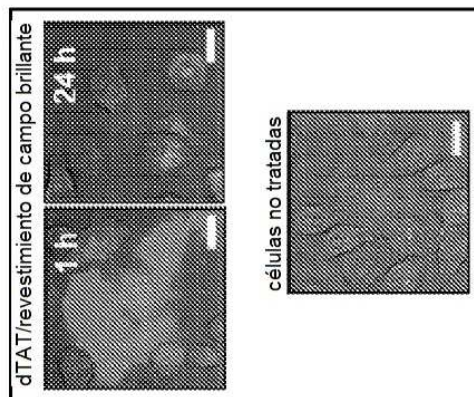


FIG. 10A

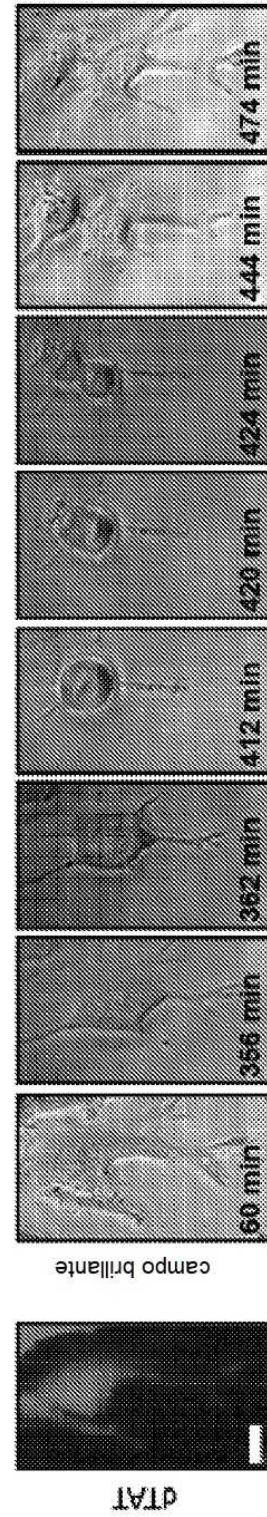


FIG. 10D

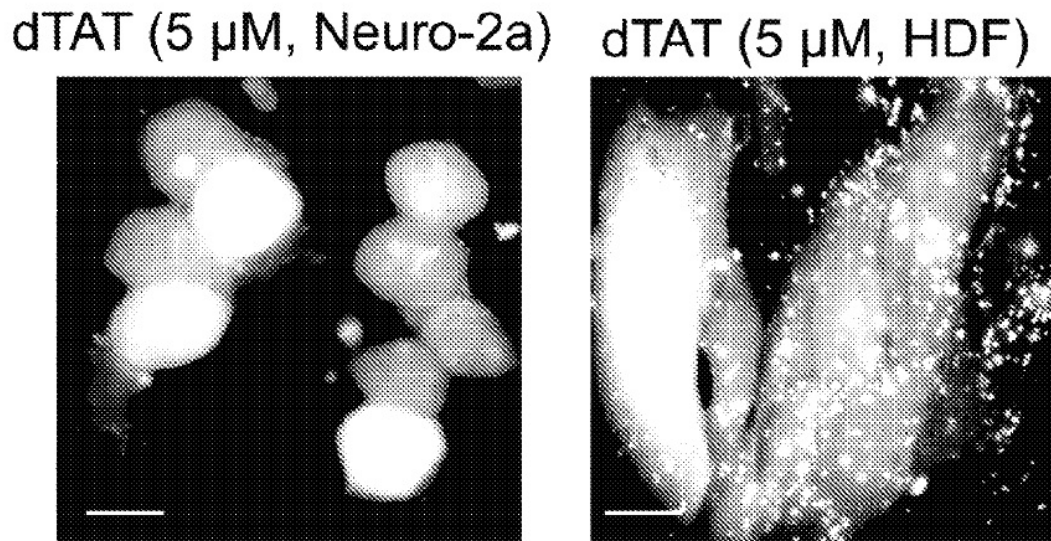


FIG. 11

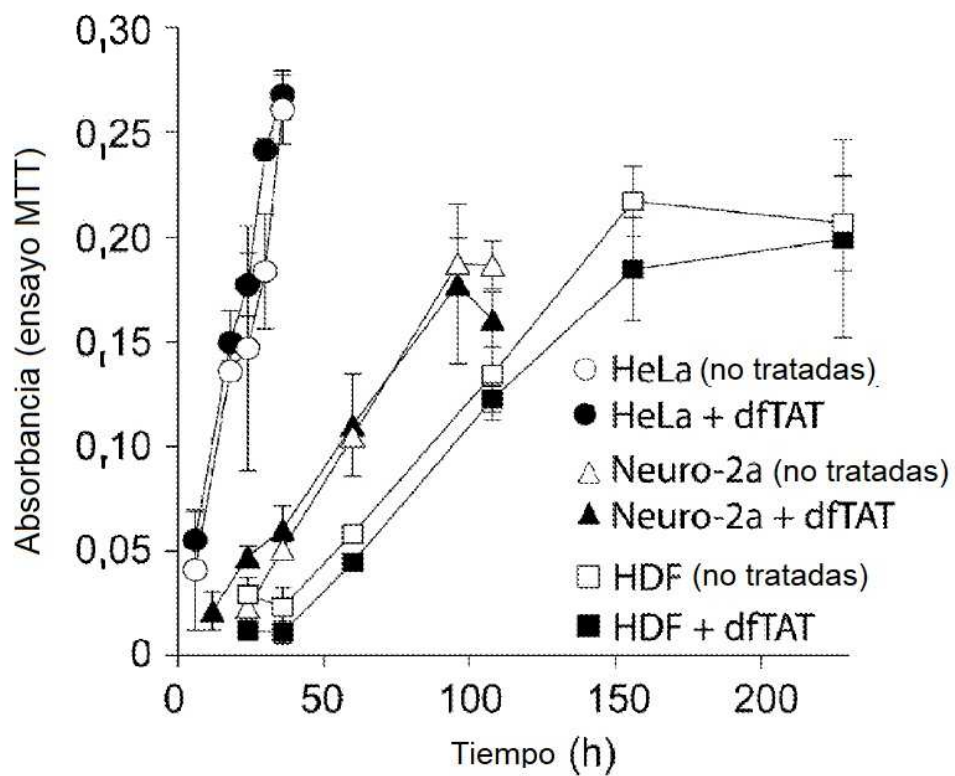


FIG. 12

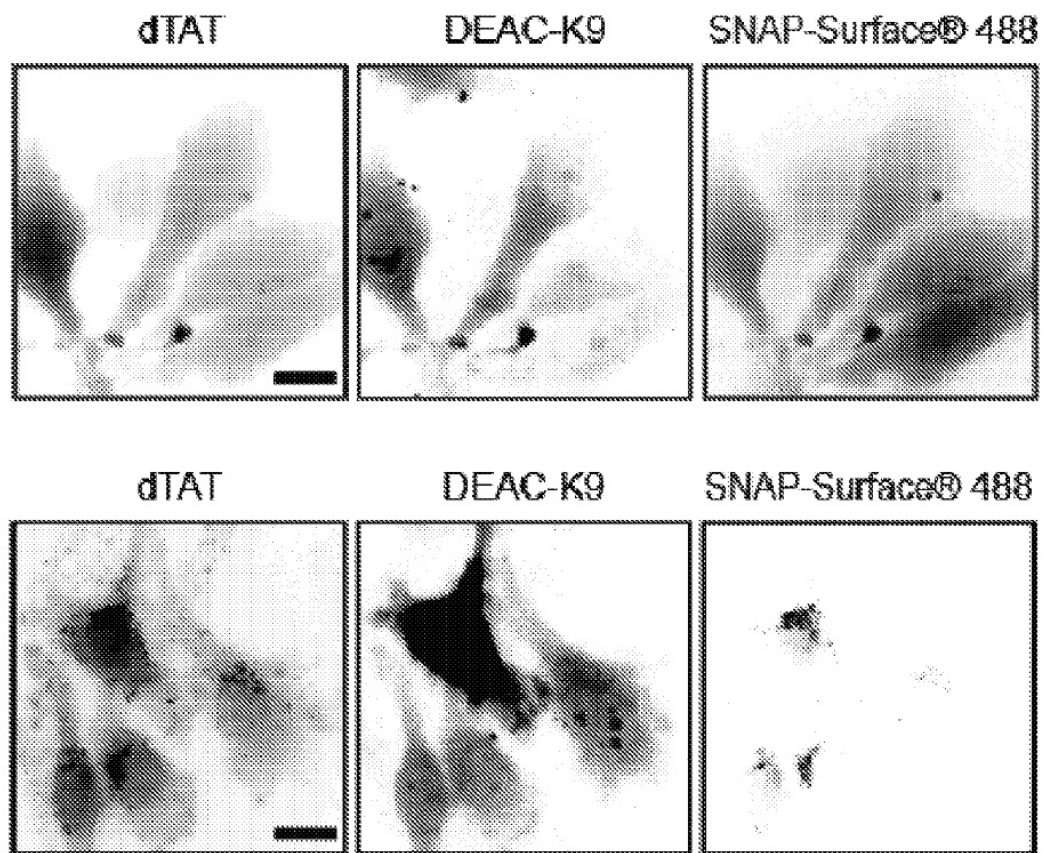


FIG. 13

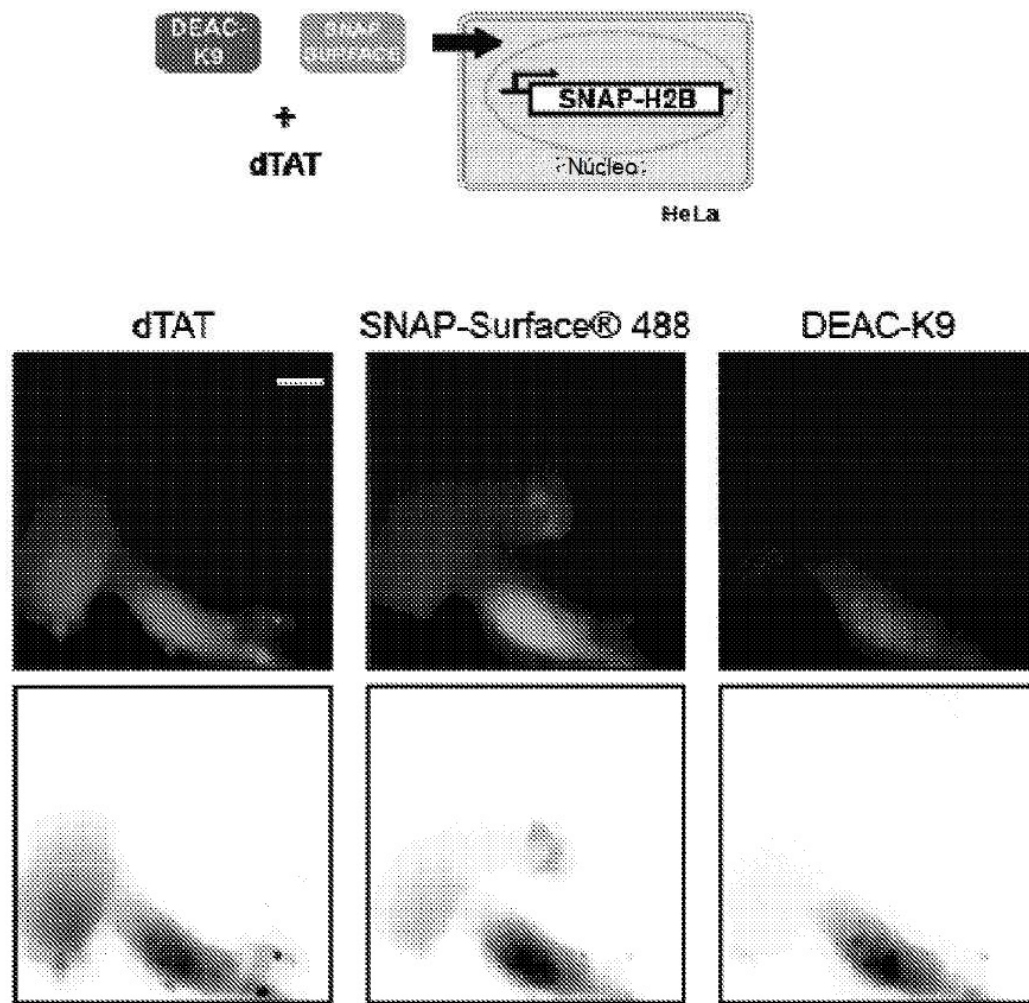


FIG. 14A

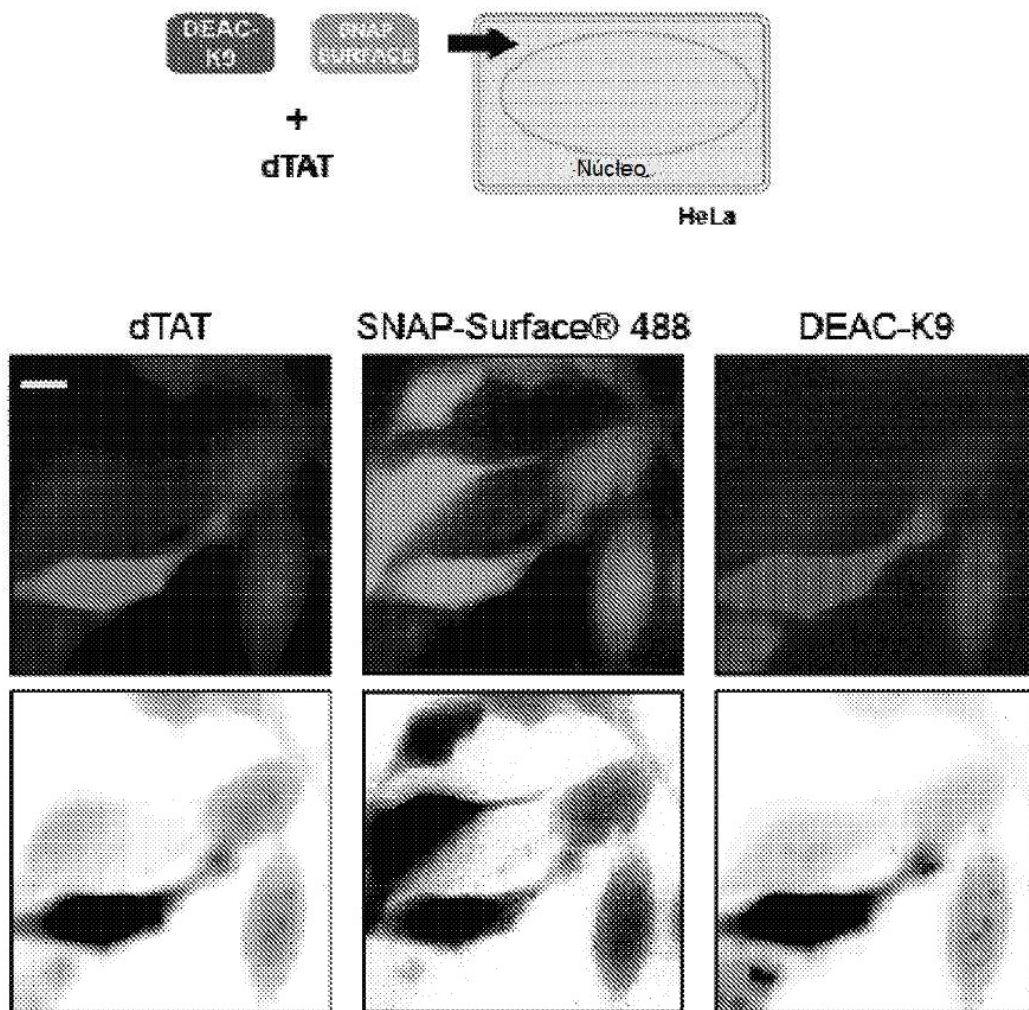


FIG. 14B

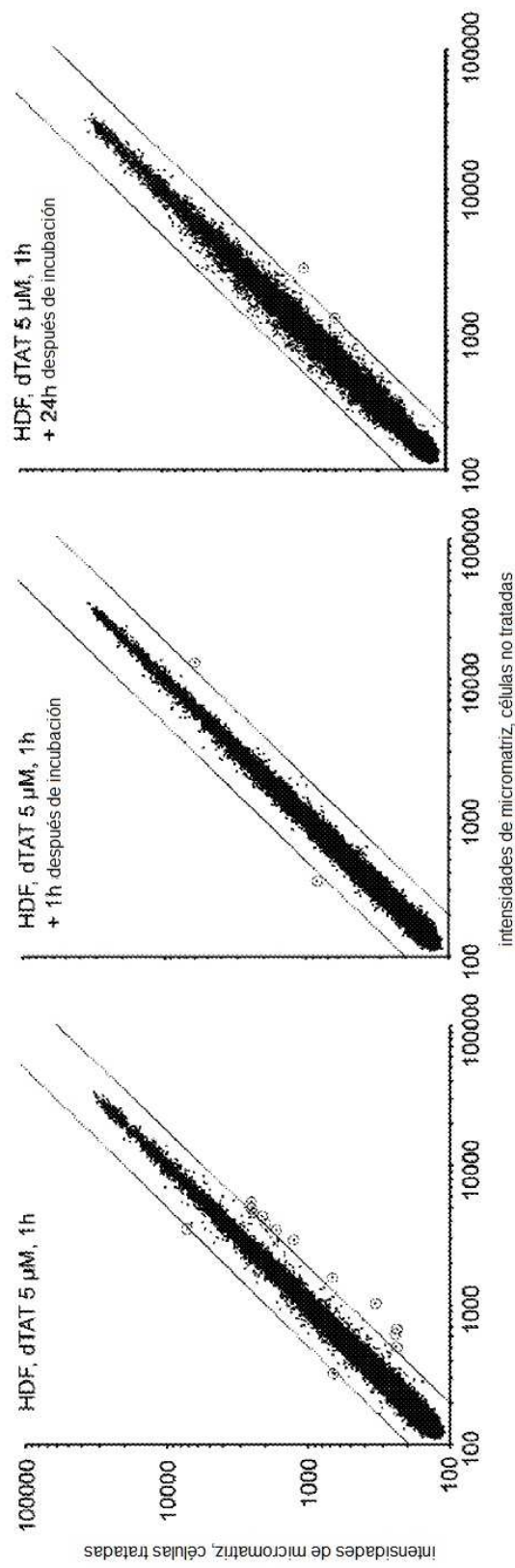


FIG. 15

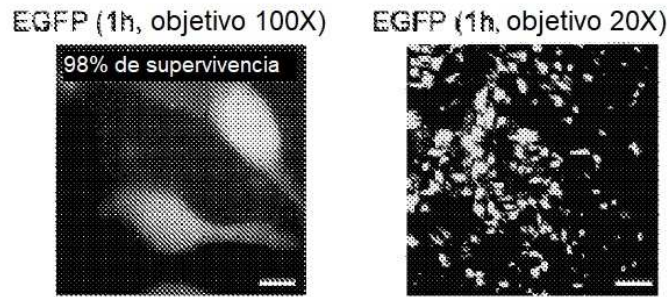


FIG. 16A

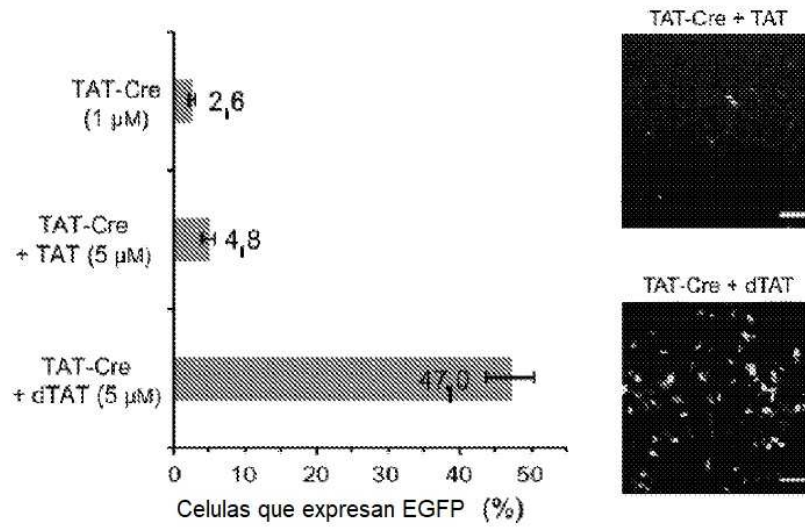


FIG. 16B

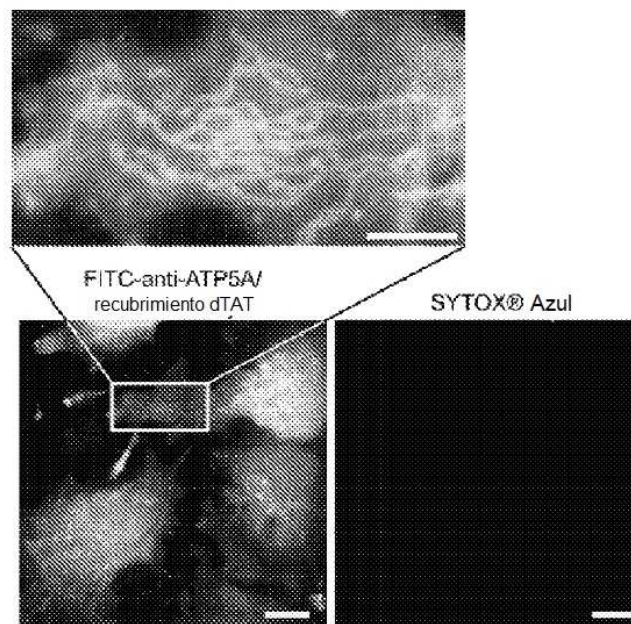


FIG. 16C

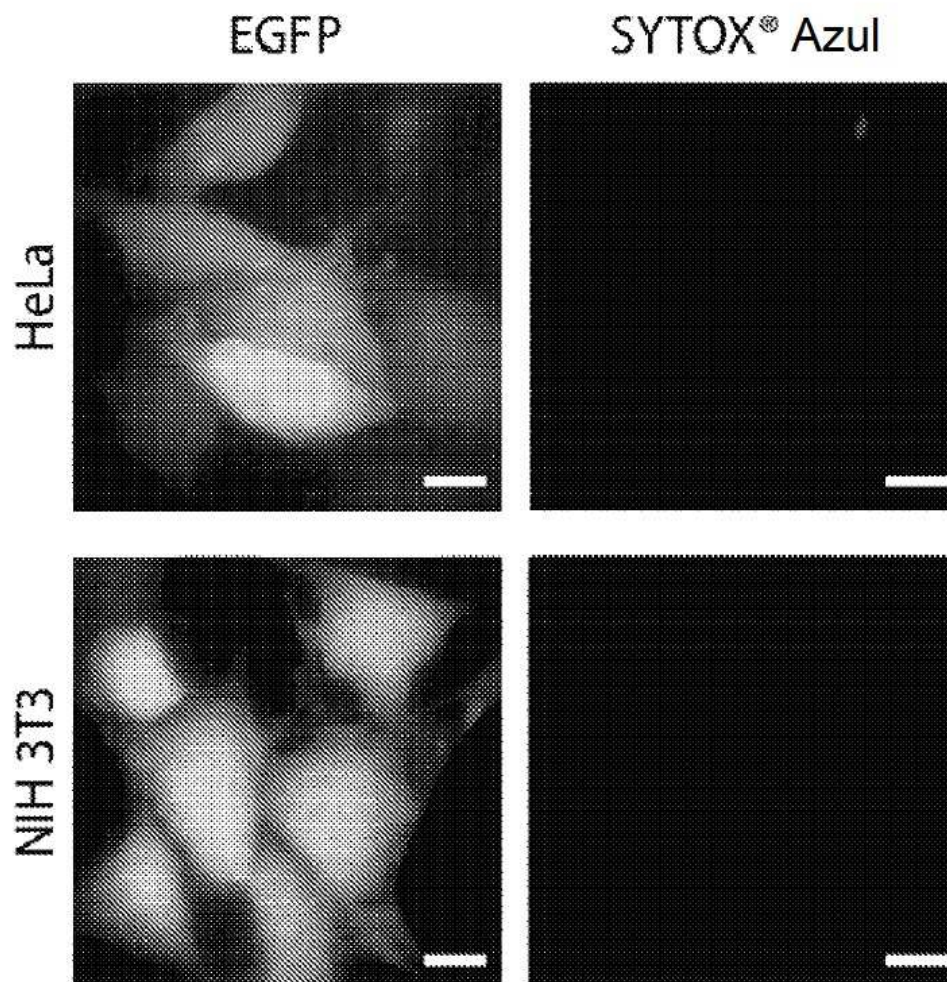
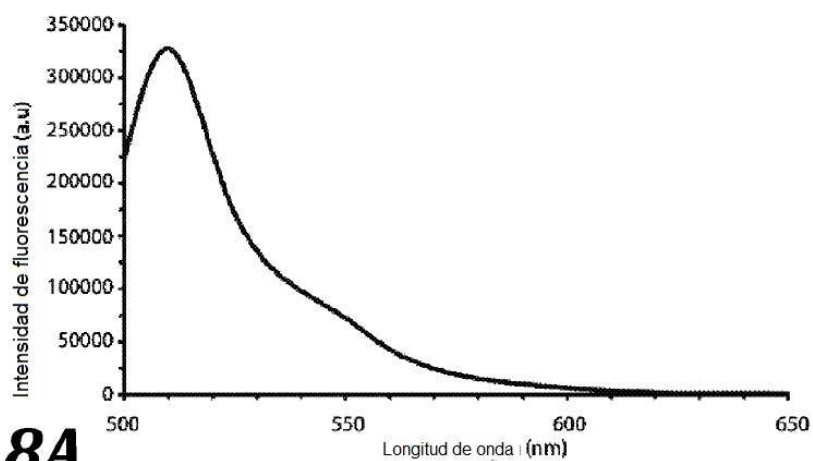
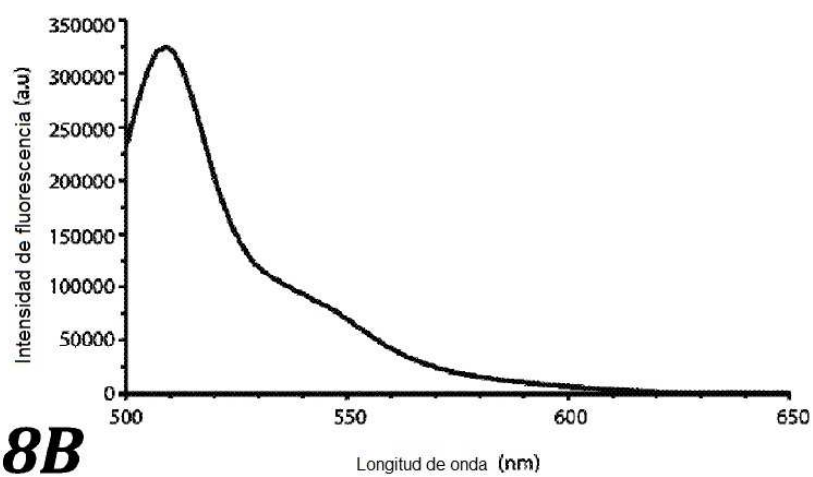
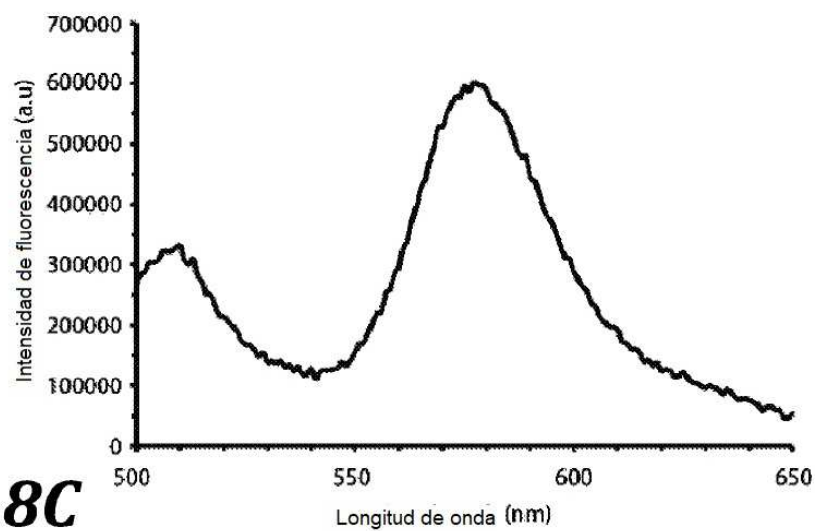


FIG. 17

**FIG. 18A****FIG. 18B****FIG. 18C**

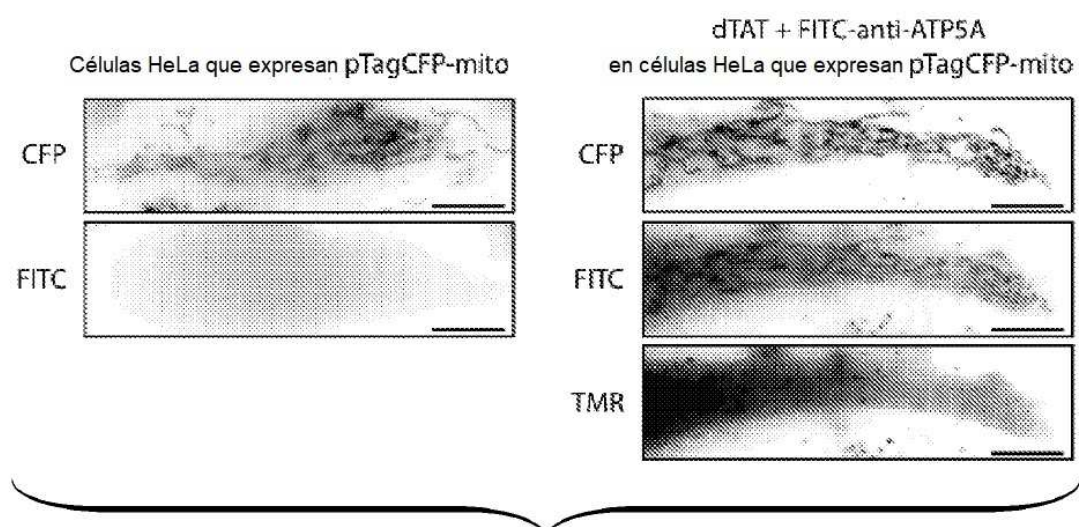


FIG. 19A

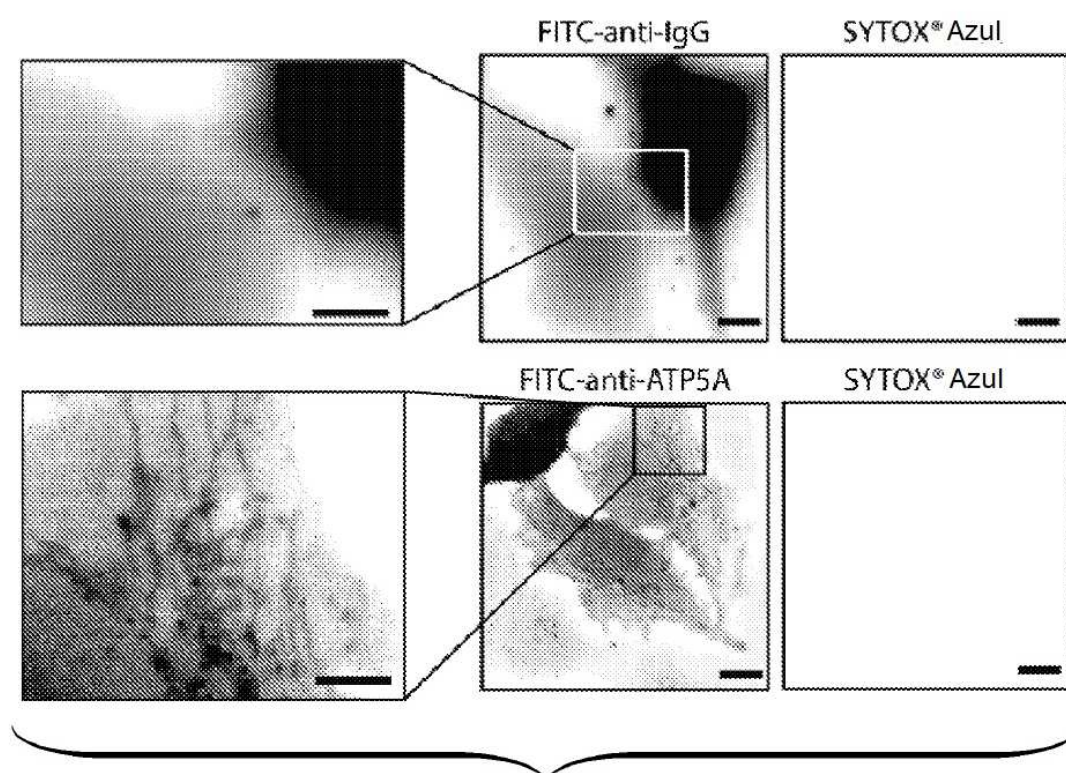
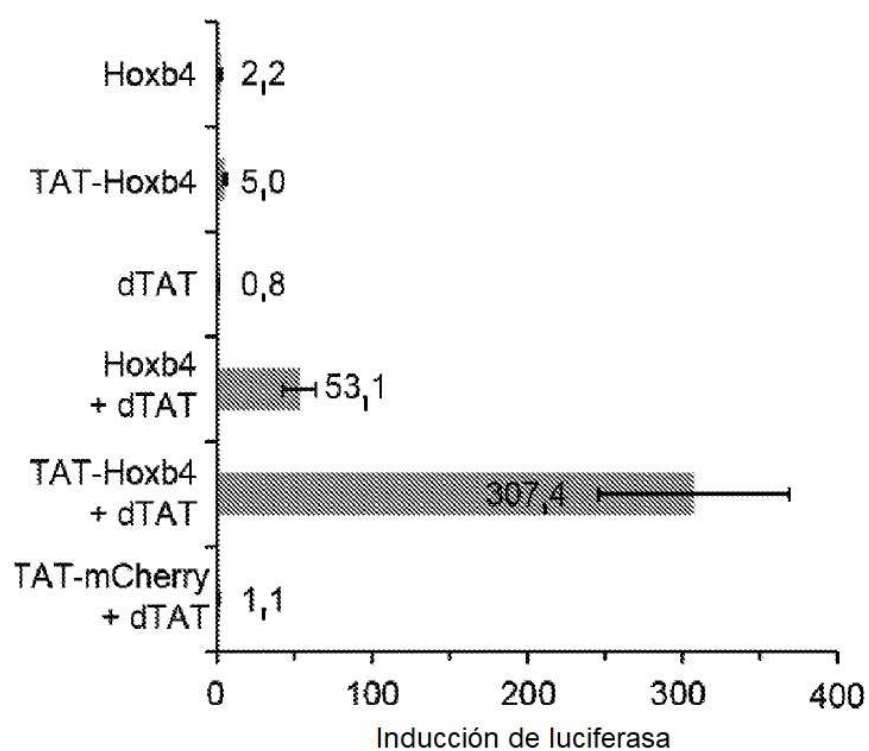
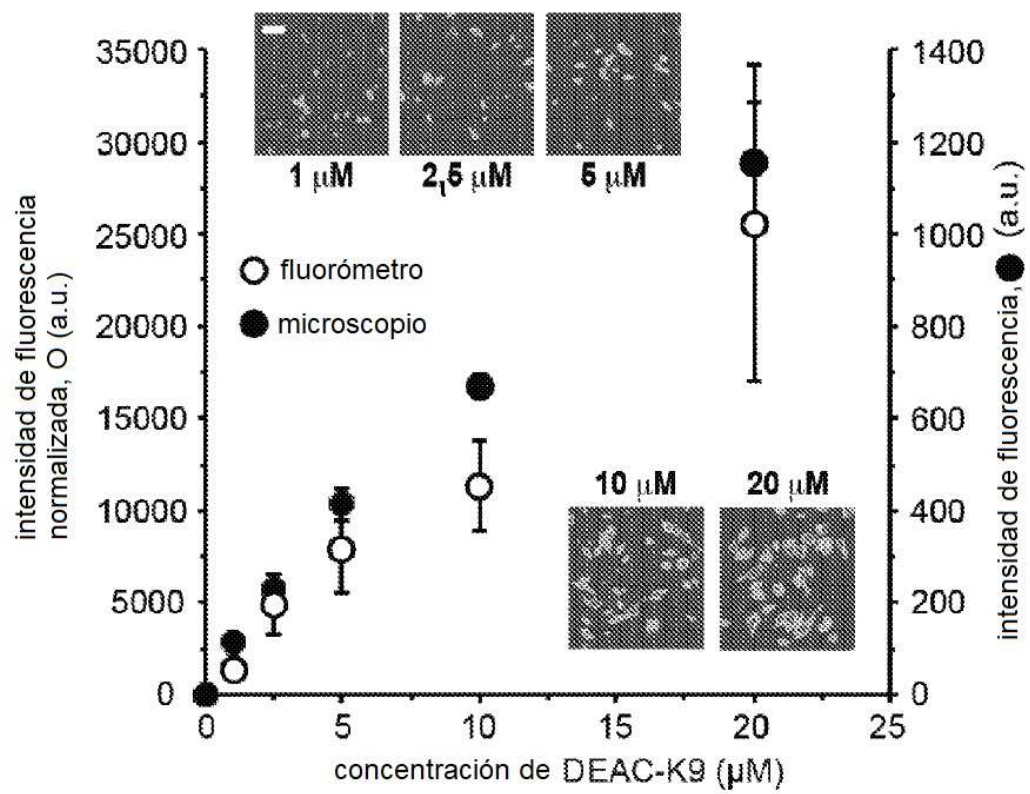
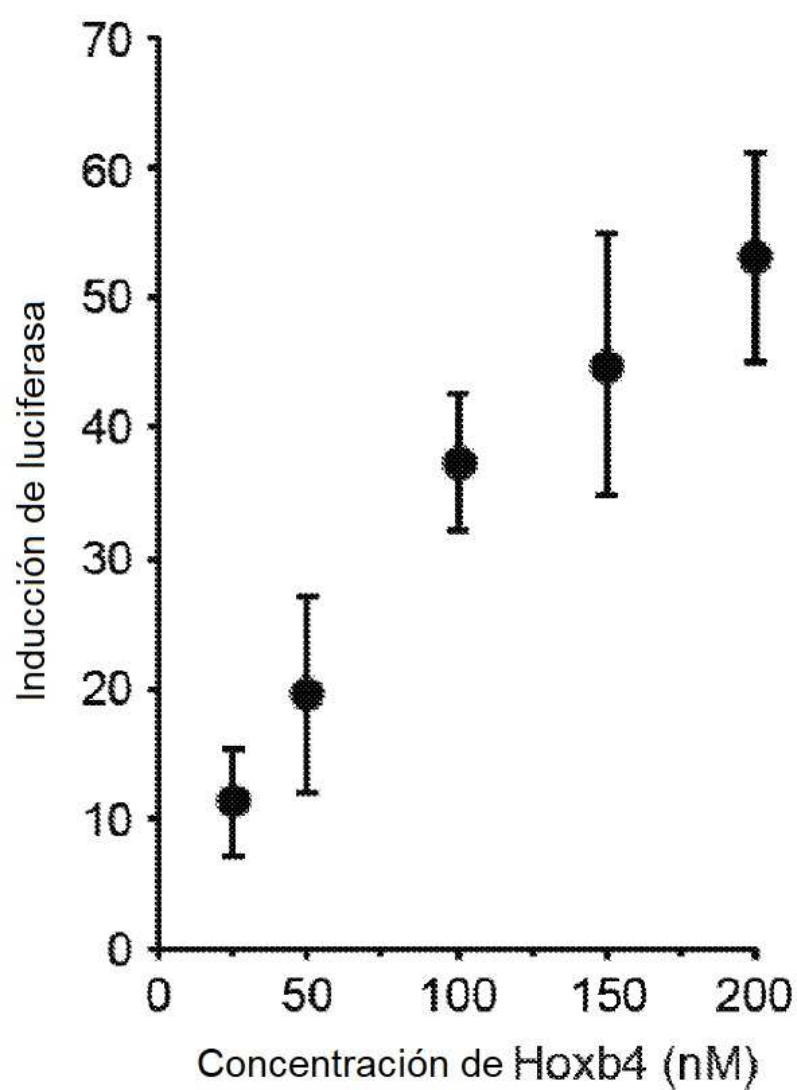


FIG. 19B

***FIG. 20A***

**FIG. 20B**

***FIG. 20C***

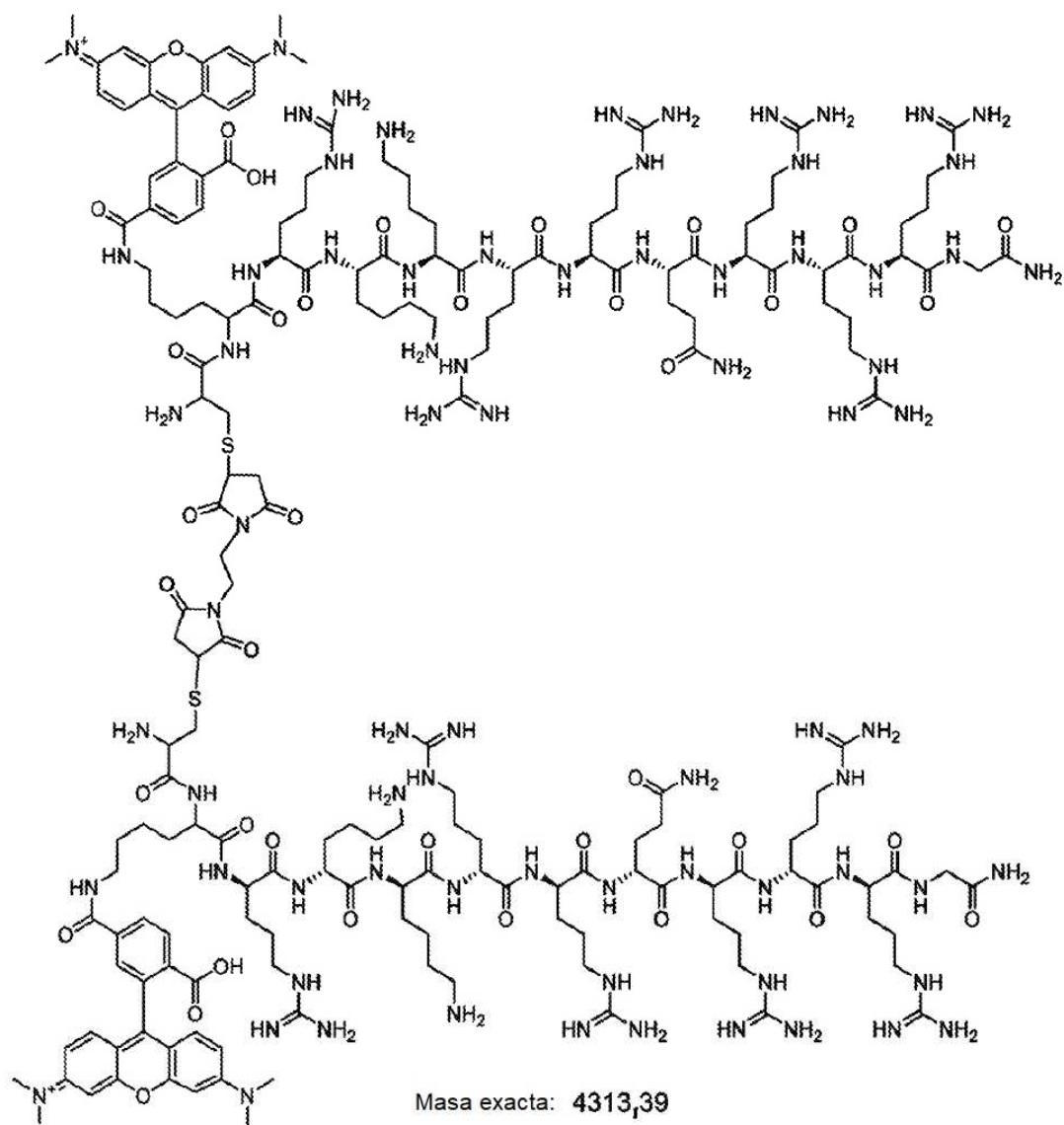


FIG. 21

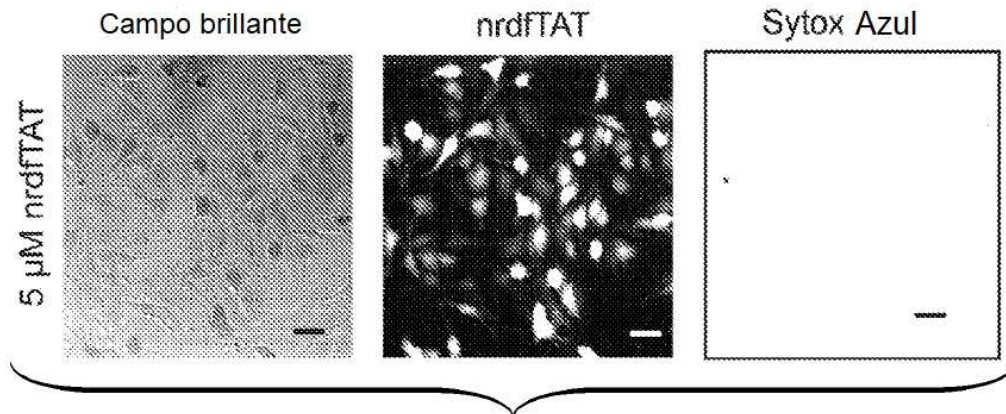


FIG. 22A

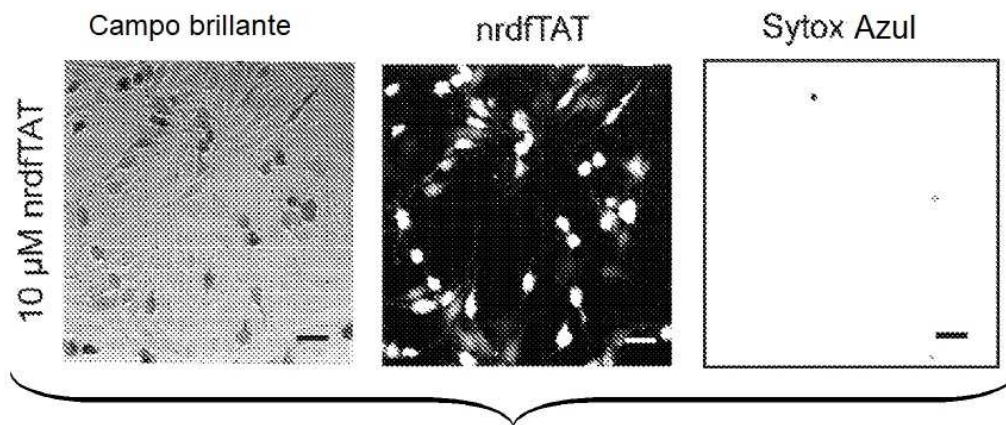


FIG. 22B

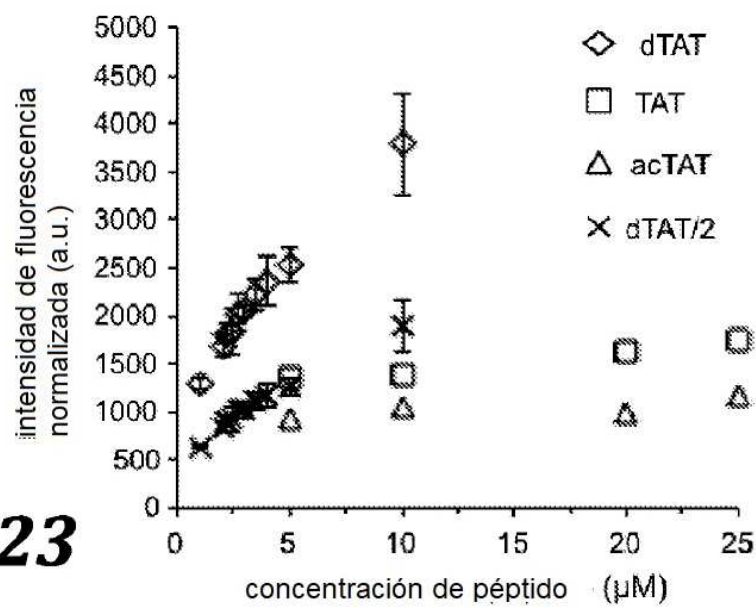


FIG. 23