

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 981 865**

(51) Int. Cl.:

<b>A61K 47/64</b>	(2007.01)	<b>A61P 35/02</b>	(2006.01)
<b>A61K 49/00</b>	(2006.01)	<b>A61P 37/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 49/04</b>	(2006.01)	<b>A61P 37/02</b>	(2006.01)
<b>A61K 49/14</b>	(2006.01)	<b>A61P 43/00</b>	(2006.01)
<b>C07K 7/08</b>	(2006.01)		
<b>A61K 38/00</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/711</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/713</b>	(2006.01)		
<b>A61P 1/16</b>	(2006.01)		
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)		

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2013 PCT/KR2013/006218**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14010971**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2013 E 13816880 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2024 EP 2873678**

---

(54) Título: **Conjugado que comprende un péptido de penetración celular y composiciones que comprenden el mismo**

(30) Prioridad:

11.07.2012 KR 20120075444  
19.09.2012 KR 20120104173  
28.09.2012 KR 20120109207  
18.02.2013 KR 20130017046  
19.04.2013 KR 20130043635

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.10.2024**

(73) Titular/es:

GEMVAX & KAEI CO., LTD. (100.0%)  
58, Techno 11-ro, Yuseong-gu  
Daejeon 34036, KR

(72) Inventor/es:

KIM, SANG JAE

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 981 865 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**

Conjugado que comprende un péptido de penetración celular y composiciones que comprenden el mismo

**5 Campo de la invención**

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

10

**10 Antecedentes**

Aunque las sustancias de bajo peso molecular, ácidos nucleicos, proteínas, nanopartículas, etc., tienen un gran potencial como sustancias terapéuticas a un nivel molecular, sus usos son limitados debido a la incapacidad de penetrar en los tejidos y la membrana celular. El desarrollo de un sistema para administrar tales sustancias a la célula ha sido el área activa de investigación durante las últimas dos décadas, transportar las sustancias dentro de la célula ha sido un tema de conversación en un tratamiento del método molecular. Las sustancias de bajo peso molecular, ácidos nucleicos o nanopartículas se transportaron al interior de la célula mediante varios reactivos, electroporación o choque térmico. Sin embargo, fue difícil encontrar un método adecuado para administrar proteínas en el interior de la célula sin alterar la actividad y la integridad de proteínas. En la década de 1980, en la investigación realizada para estudiar la capacidad de penetración celular del VIH, se descubrió que la proteína TAT del VIH, que se compone de 11 aminoácidos específicos, desempeña un papel importante en un proceso de transporte al interior de la célula. Por lo tanto, en la década de 1990, los estudios para encontrar el método correcto de transporte de proteínas al interior de la célula han sido un área intensa de investigación. El documento WO 2012/033272 A1 divulga un péptido bioactivo permeable a las células derivado humano (derivado de proteína morfogenética ósea humana) conjugado con un péptido bioactivo, y el uso terapéutico del conjugado para tratar enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias.

El telómero se conoce como una secuencia repetitiva de material genético que se encuentra en los extremos de cromosomas que evita que los cromosomas se dañen o se fusionen con otros cromosomas. La longitud del telómero se acorta en cada división celular y, después de un cierto número de divisiones celulares, la longitud del telómero se acorta extremadamente hasta el punto en que la célula deja de dividirse y muere. Por otro lado, se sabe que el alargamiento de los telómeros prolonga la vida útil de una célula. Para un ejemplo, las células cancerosas excretan una enzima denominada telomerasa, que previene el acortamiento de los telómeros, dando como resultado así la proliferación de células cancerosas.

El objetivo de esta invención es proporcionar un péptido de penetración celular como vehículo de un principio activo en una célula, especialmente administrarlo a las mitocondrias localmente.

40 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un conjugado en el que se conjugan un principio activo y un péptido de penetración celular.

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

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

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

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

55 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un agente de contraste que comprende un conjugado de un principio activo y un péptido de penetración celular.

**Sumario de la invención**

60 La presente invención proporciona un conjugado de un péptido vehículo de penetración celular y un principio activo, en donde el péptido vehículo consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y en donde el principio activo se selecciona de una proteína, un ácido nucleico, un péptido, un mineral, un azúcar, una nanopartícula, un producto biológico, un agente de contraste, un fármaco y un compuesto químico, en donde el péptido vehículo y el principio activo se combinan a través de un enlace covalente a través del extremo C del péptido vehículo.

65

En una realización de la invención, el principio activo es

- a) un ADN o un ARN, en donde el péptido vehículo se conjuga con ADN a través de polilisina cuando el principio activo es un ADN; o
- 5 b) una proteína o un péptido, opcionalmente una citocina, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, enzima terapéutica, receptor soluble o ligando.
- En una realización de la invención, el péptido vehículo y el principio activo se combinan a través de un enlace covalente, mediado selectivamente por un enlazador.
- 10 En una realización de la invención, el péptido vehículo se combina con isotiocianato de fluoresceína o proteína fluorescente verde (GFP).
- En una realización de la invención, el principio activo es un agente de contraste.
- 15 En una realización de la invención, el agente de contraste se selecciona del grupo que consiste en un agente de contraste radiopaco, agente de contraste paramagnético, agente de contraste superparamagnético y agente de contraste para TAC.
- 20 En una realización de la invención, el agente de contraste es a base de hierro, opcionalmente un carboxilato de ferroceno.
- En una realización de la invención, el conjugado es para su uso en la obtención de imágenes de una célula, opcionalmente una célula madre.
- 25 En una realización de la invención, el péptido vehículo se mueve localmente hacia el citoplasma y desempeña un papel de entrega citoplasmática local del principio activo, opcionalmente, en donde el péptido vehículo se mueve localmente hacia una mitocondria y desempeña un papel de entrega mitocondrial local del principio activo.
- 30 La presente invención proporciona también una composición que comprende el conjugado, que es una composición farmacéutica, una composición cosmética o una composición de alimento saludable.
- En una realización de la invención, la composición farmacéutica es para su uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno canceroso o inmunitario.
- 35 En una realización de la invención, la composición farmacéutica es para uso en la modulación de la actividad mitocondrial en un método de tratamiento, profilaxis, supresión de la progresión o alivio de síntomas de una enfermedad o trastorno relacionado con las mitocondrias y seleccionado del grupo que consiste en enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, MELAS (encefalomiopatía mitocondrial con acidemia láctica y episodios similares a accidentes cerebrovasculares); MERRF (mioclono, epilepsia y miopatía con fibras rojas rasgadas); NARP/MILS (debilidad muscular neurogénica, ataxia, retinitis pigmentosa/síndrome de Leigh de herencia materna); LHON (neuropatía óptica hereditaria de Leber); KSS (síndrome de Kearns-Sayre); PMPS (Síndrome de médula ósea-páncreas de Pearson); CPEO (oftalmoplejía externa progresiva crónica); síndrome de Reye; síndrome de Alper; síndrome de delección del ADNmt múltiple; síndrome de depleción del ADNmt; deficiencia del complejo I; deficiencia del complejo II (SDH); deficiencia del complejo III; deficiencia de la citocromo c oxidasa (COX, complejo IV); deficiencia del complejo V; deficiencia del translocador de nucleótidos de adenina (ANT); deficiencia de la piruvato deshidrogenasa (PDH); aciduria de ácido etilmalónico con acidemia de ácido láctico; aciduria de ácido 3-metilglutacónico con acidemia de ácido láctico; epilepsia refractaria que representa un deterioro durante la infección; síndrome de Asperger que representa un deterioro durante la infección; autismo que representa un deterioro durante la infección; trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH); parálisis cerebral que representa un deterioro durante la infección; alexia que representa un deterioro durante la infección; trombocitopenia de herencia materna; leucemia; MNGIE (miopatía mitocondrial, neuropatía periférica y autonómica, disfunción gastrointestinal y epilepsia); síndrome de MARIAHS (ataxia mitocondrial, infección recrudescente, afasia, hipouricemia/hipomielinización, convulsiones y aciduria por ácido dicarboxílico); distonía de ND6; síndrome de vómitos cíclicos que representa un deterioro durante la infección; aciduria de ácido 3-hidroxisobutírico con acidemia de ácido láctico; diabetes con acidemia de ácido láctico; síndrome neural reactivo a la uridina (URNS); necrosis estriatal bilateral familiar (FBSN); pérdida de audición relacionada con aminoglucósido; miocardiopatía relajada; linfoma de bazo; síndrome de Wolfram; síndrome de delección del ADN mitocondrial múltiple; y síndrome de acidosis tubular renal/diabetes/ataxia, en donde el péptido vehículo es un péptido vehículo que se mueve localmente hacia una mitocondria y desempeña un papel de entrega mitocondrial local del principio activo, y en donde el principio activo es un ingrediente para el tratamiento, profilaxis, la supresión de la progresión o el alivio de síntomas de la enfermedad o el trastorno relacionado con mitocondrias.
- 40 La presente invención también proporciona un método para administrar un principio activo a una célula, opcionalmente a mitocondrias dentro de una célula, en donde el método comprende una etapa de administrar un conjugado de un péptido vehículo de penetración celular y un principio activo a una célula *in vitro*, en donde el péptido vehículo es un péptido de penetración celular que realiza la administración del principio activo a la célula y comprende la secuencia de
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

En una realización de la invención, el conjugado es el conjugado de acuerdo con una de las realizaciones anteriores.

- 5 La presente invención también proporciona el uso *in vitro* de un péptido de penetración celular para transportar un principio activo al interior de una célula, opcionalmente a mitocondrias, en donde el péptido de penetración celular comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

#### **Aplicabilidad industrial**

- 10 Los principios activos que son difíciles de transportar dentro de una célula se pueden transportar fácilmente dentro de una célula usando el péptido, o el conjugado del péptido y principios activos, divulgados en la presente invención. Esto significa que se puede aumentar la eficacia de los principios activos y, por lo tanto, se puede reducir la dosificación. Como resultado, se pueden minimizar los efectos secundarios debidos a la administración de fármacos y se puede aumentar la eficacia del tratamiento. Especialmente, con la administración de fármacos a las mitocondrias, se pueden mejorar las enfermedades o trastornos relacionados con las mitocondrias y se puede aumentar la eficacia de la profilaxis y el tratamiento de enfermedades. En el caso de los cosméticos, con una pequeña cantidad de principios activos, puede crear un efecto excepcional. Al conjugar un péptido con una sustancia de contraste, se puede usar como sustancia de contraste para monitorizar un proceso de trasplante celular o células transplantadas en un tratamiento celular. Especialmente, se puede usar eficazmente como sustancia de contraste para células madre inyectadas dentro del organismo.

#### **Breve descripción de los dibujos**

- 25 La figura 1 representa una esquematización de construcciones de fusión de proteína fluorescente verde (GFP) producidas en el vector pET28a con los sitios de enzima de restricción (EcoRI y HindIII). 16-meros representa SEQ ID NO: 1 (pep1).

- 30 La figura 2 representa una esquematización del vector pET-28a(+) usado para generar una construcción de fusión con SEQ ID NO: 1 (pep1) y proteína fluorescente verde.

- 35 La figura 3 representa el resultado de la absorción celular de FITC (CHO-F, grupo control, línea azul), CHO-TAT-F (péptido TAT marcado con FITC, línea verde), CHO-F-pep-1 (pep1 marcado con FITC en el extremo N, línea azul) y CHO-pep1-F (pep1 marcado con FITC en el extremo C, línea rosa) en células CHO. Células CHO se trataron con los péptidos como se describe anteriormente durante 1 hora, se recogieron y se analizaron mediante FACS. La línea roja representa el valor de fondo de las células CHO no tratadas con ningún péptido.

- 40 La figura 4 representa el resultado de la absorción celular de la línea celular HepG2 tratada con FITC (HepG2-F, grupo control, línea azul), HepG2-TAT-F (péptido TAT marcado con FITC, línea verde), HepG2-F-pep1 (pep1 marcado con FITC en el extremo N, línea naranja) y HepG2-pep1-F (pep1 marcado con FITC en el extremo C, la línea azul) en células HepG2. Las células se trataron con los péptidos como se describe anteriormente durante 1 hora, se recogieron y se analizaron mediante FACS. La línea roja representa el valor de fondo de las células HepG no tratadas con ningún péptido.

- 45 La figura 5 representa la absorción celular de TAT-F (TAT marcado con FITC), F-pep1 (pep1 marcado con FITC en el extremo N) y pep1-F (pep1 marcado con FITC en el extremo C) en células CHO mediante FACS. Las células se trataron con los péptidos durante 1 hora antes del análisis de FACS (el grupo de control corresponde al valor de fondo de la línea celular CHO).

- 50 La figura 6 representa la absorción celular de TAT-F (TAT marcado con FITC), F-pep1 (pep1 marcado con FITC en el extremo N) y pep1-F (pep1 marcado con FITC en el extremo C) en células HepG2 mediante FACS. Las células se trataron con los péptidos durante 1 hora antes del análisis de FACS (el grupo de control corresponde al valor de fondo de la línea celular HepG2).

- 55 La figura 7 representa la absorción celular del péptido con SEQ ID NO: 1 marcado con FITC en células HeLa. Las células se trataron con el péptido durante 1 hora y se analizaron mediante FACS (los grupos de control fueron los tratados únicamente con FITC).

- 60 La figura 8 representa el resultado del ensayo de toxicidad y viabilidad celular del péptido con SEQ ID NO: 1 combinado con FITC y cada uno de los cuales se usó para tratar células HeLa.

La figura 9 y la figura 10 representan el resultado de la citometría de flujo sobre la propiedad de penetración celular de pep1 en la línea celular Huh7.

- 65 La figura 11 y la figura 12 representan el resultado de la citometría de flujo sobre la propiedad de penetración celular de pep1 en la línea celular linfocitos T humanos.

- La figura 13 y la figura 14 representan el resultado de la citometría de flujo y el análisis de microscopía confocal sobre la propiedad de penetración celular de pep1 basándose en la posición de la conjugación de FITC.
- 5 La figura 15 y la figura 16 representan el resultado del análisis de microscopio confocal del péptido TAT y PEP1 en líneas celulares MCF7, Huh7 y HepG2 para mostrar la diferencia en el nivel de señales de fluorescencia intracelular entre el péptido TAT y pep1.
- 10 La figura 17 es un gráfico que representa una dispersión media del coeficiente de Pearson de señales de fluorescencia intracelular del péptido TAT y PEP1 en líneas celulares MCF7, Huh7 y HepG2.
- 15 Las figura 18 a la figura 23 representan el resultado analítico basándose en la concentración de PEP1 en líneas celulares Huh7, bmDC (células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón), CHO, COS7, la figura 24 a la figura 26 representan el resultado de pep1 dependiendo del tiempo.
- 20 15 La figura 27 a la figura 31 representan el resultado de la propiedad de penetración celular de PEP1 analizada mediante citometría de flujo y microscopio confocal; en donde diferentes concentraciones de pep1, temperatura y tiempo de incubación se usaron para tratar Jurkat (línea de células T humanas), THP1 (línea celular de monocitos humanos), Rail (línea de células B), K562 (línea celular de leucemia humana).
- 25 La figura 32 a la figura 34 representan el resultado del análisis de citometría de flujo de pep1 con diferente concentración, temperatura y tiempo de tratamiento en PBMC humanas.
- 30 La figura 35 a la figura 36 representan el resultado del análisis de citometría de flujo de pep1 con tratamiento químico en PBMC y Jurkat humanas.
- 35 La figura 37 representa el resultado del análisis de citometría de flujo realizado para comparar la propiedad de penetración celular de pep1 mediante la adición de diversos anticuerpos; en donde pep1 se trató con anticuerpos frente a HSP70, enloasa, GAPDH (Santacruz) y HSP90.
- 40 La figura 38 es un diagrama que representa la absorción celular de ferrocenocarboxílico-pep1 en células madre neuronales (NSC) de rata a lo largo del tiempo.
- 45 La figura 39 es un diagrama que representa la absorción celular de ferrocenocarboxílico-pep1 en NSC de rata medida mediante un sistema de exploración con láser confocal, se usó DAPI para teñir el núcleo. Ferrocenocarboxílico-pep1 y teñir el núcleo celular con DAPI.
- 50 La figura 40 representa los efectos de ferrocenocarboxílico-pep1 sobre la viabilidad y citotoxicidad celular analizadas mediante ensayos del kit de recuento celular 8 (CCK-8) y ensayo de activación de lactato deshidrogenasa (LDH).
- 55 La figura 41 es un diagrama de imagen de RM cerebral del cerebro de células madre con grupo de ferrocenocarboxílico-pep1 tratadas con ferrocenocarboxílico-pep1, la figura 42 es un diagrama de RM de células madre cerebrales con grupo de ferrocenocarboxílico-pep1 no tratadas con ferrocenocarboxílico-pep1, la figura 43 es un diagrama de RM del cerebro del grupo de ferrocenocarboxílico-pep1, y la figura 44 es un diagrama de RM del cerebro del grupo de solución salina.
- 60 La figura 45 representa un vector pET28a(+) (Promega) para generar un conjugado del péptido con SEQ ID NO: 1 y proteína fluorescente verde (GFP).
- 65 La figura 46 representa un mapa del vector pET-28a y la figura 47 es un diagrama de clonación.
- 55 La figura 48 muestra la estrategia de clonación usada para generar el plásmido de expresión de GFP en el vector pET.
- 60 La figura 49 muestra un principio de inducción de IPTG en la transformación bacteriana.
- 65 La figura 50 representa el resultado de la propiedad de penetración celular de GFP combinada con pep1 en diversas líneas celulares analizadas mediante un microscopio de fluorescencia.
- 65 La figura 51 representa el resultado de análisis de citometría de flujo que muestran la absorción celular de GFP, TAT y pep1 en diversas líneas celulares.
- 65 La figura 52 representa la estructura primaria del péptido usado para generar el conjugado de ADN (polilisina)-cpp, la figura 53 es una representación esquemática de los conjugados de polilisina en la figura 52.

La figura 54 representa la movilidad electroforética del ADN combinado con el péptido.

5 La figura 55 representa el resultado de la propiedad de penetración celular del ADN administrado por pep1 conjugado con polilisina, como se mide mediante el ensayo de luciferasa dependiente de hTERT en diversas líneas celulares.

La figura 56 representa el resultado del grado de absorción celular de ARNip mediante poli-lisina-pep1-FITC combinado con poli-lisina-pep1-FITC para la administración a la célula.

10 La figura 57 representa el resultado del ensayo de luciferasa que muestra la reducción en la actividad de luciferasa mediante la entrada adecuada de ARNip de luciferasa conjugado con pep1 en la línea celular Huh7.

15 La figura 58 representa el resultado del ensayo de luciferasa que muestra la reducción en la actividad de luciferasa mediante la entrada adecuada de ARNip de luciferasa conjugado con pep1 en la línea celular CHO.

15 La figura 59 es un diagrama que representa el resultado de la localización celular del conjugado pep1-FITC con marcadores de localización mitocondrial, mitotrackers® con deep red FM 644/665nm (Invitrogen) (A) Tratamiento del conjugado pep1-GFP en células MCF-7 solo (B) Tratamiento del marcador de localización mitocondrial, mitotrackers® deep red FM 644/665nm (Invitrogen) solo (c) Contraste de fase de la célula, (D), un diagrama combinado de A y B.

20 La figura 60 representa el resultado del análisis de transferencia Western del conjugado pep1-GFP con anticuerpo hsp70 mitocondrial; en donde el conjugado se trató con la línea celular MCF7 (adenocarcinoma de mama humano).

25 La figura 61 es un diagrama que representa la absorción celular de pep1-GFP en la línea celular HepG2.

#### **Descripción detallada de la invención**

30 Proteínas, ácidos nucleicos, péptidos o virus, etc. tienen un gran potencial para ser usados como sustancias terapéuticas. Sin embargo, sus usos son limitados porque no pueden penetrar en los tejidos y las membranas celulares debido al tamaño de los niveles moleculares. Aunque el tamaño de las moléculas es pequeño, no pueden penetrar en la bicapa lipídica debido a la estructura o características de las moléculas. Por lo tanto, a través del uso de electroporación, choque térmico, etc., hubo intentos de transportar proteínas, ácidos nucleicos, péptidos o virus dentro de la célula; era difícil transferirlos sin dañar la membrana celular ni mantener los estados activos de las moléculas anteriores. Se han realizado muchos estudios desde que se demostró que la proteína TAT (activador transcripcional transactivador) derivada del VIH (virus de inmunodeficiencia humana) funciona como péptido de penetración celular que puede transportar enormes sustancias activas dentro de la célula. Específicamente, se han realizado estudios sobre sustancias que pueden transportar moléculas enormes tal como proteínas, ácidos nucleicos, péptidos o virus dentro de la célula sin provocar ninguna toxicidad, a diferencia de la proteína TAT que provoca toxicidad dentro de la célula. Por lo tanto, la presente invención se completó porque los presentes inventores descubrieron que péptidos derivados de la telomerasa tienen una eficacia excepcional como péptido de penetración celular sin una toxicidad perceptible.

40 45 50 El péptido descrito en SEQ ID NO: 1 es el mismo que el de la siguiente tabla 1. SEQ ID NO: 2 enumera el orden de longitud total de la proteína telomerasa humana. SEQ ID NO: 1 enumera el péptido derivado de la telomerasa que se compone de secuencias de 16 aminoácidos. El "nombre" en la Tabla 1 siguiente se usó para distinguir los péptidos. En una realización específica diferente de la presente invención, más de un péptido de los péptidos mencionados en SEQ ID NO: 1 incluyen "péptidos sintéticos", los péptidos sintetizados de áreas seleccionadas de la telomerasa. En la presente memoria descriptiva, el término "pep" en el presente documento se refiere a péptidos que tienen SEQ ID NO: 1 o péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos por encima del 80 % de homología con la secuencia mencionada anteriormente, o fragmentos del péptido mencionado anteriormente.

# ES 2 981 865 T3

[TABLA 1]

SEQ ID NO.	Nombre	POSICIÓN EN TELOMERASA	SECUENCIA	LONGITUD
1.	pep1	[611-626]	EARPALLTSRLRFIPK	16 aa
2.	Telomerasa	[1-1132]	MPRAPRCRAVRSLRLRSIHYREVLPLATF VRRLGPQGWRLVQRGDPAFRALVAQC LVCVPWDARPPAAPSFRQVSCLKELV ARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGAR GGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSG AWGLLLRRVGDDVLVHLLARCALFVLV APSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPH ASGPRRRLGCERAWNHSVREAGVPLGI PAPGARRRGGSASRSRSLPLPKRPRRGAA PEPERTPVGQGSWAHPGRTRGSPDRGF CVVSPARPAEATSLEGALSGTRHSHP SVGRQHHAGPPSTSRRPPRWDTCPVV YAETKHFYSSGDKEQLRPSFLSSLR PSLTGARRLVETIIFLGSRPWMPGTPRR LPRLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPY GVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPQ GSVAAPEEEEDTDPRRRLVQLLRQHSSPW QVYGFVRACLRLVPPGLWGSRHNERR FLRNTKKFISLGKHKAKLSLQELTW KMSVRDCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLR EEILAKFLJHWLMSVYVVELLRSFFYVT ETTFQKNRLFFYRKSVWSKLQSIGIRQ HLKRVQLRELSEAEVHQHREARPALLT SRLRFIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTF RREKRAERLTSRVKALFSVLYERARR PGLLGASVGLDDIHRAWRTFVLRVRA QDPPPELYFKVDVTGAYDTIPQDRLT EVIAS11KPQNTYCVRRYAVVQKAHG HVRKAFKSHVSTLTDIQPYMRQFVAHL QETSPLRDAVVIEQSSLNEASSGLFD VFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGIPQG SILSTLLCSLCYGDMEALKFAGIRRDG LLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLV	1132 aa

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	POSICIÓN EN TELOMERASA	SECUENCIA	LONGITUD
			RGVPEYGCVNLRKTVNFPVEDEALG GTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEV QSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRН MRRKLFGVRLKCHSLFLDLQ VNSLQTVCTNIYKILLQAYRFHACVL QIPFHQQVWKNPTFFLRVISDTASLCY SILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQ WLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGSR AQTQLSRKLPGTTLALEAAANPALPS DFKTILD	

- 5 La transformación sustancial de las propiedades biológicas de los péptidos se realiza seleccionando una sustitución significativamente diferente con las siguientes eficacias: (a) la eficacia para mantener la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de sustitución, tal como estructuras tridimensionales laminares o helicoidales, (b) la eficacia para mantener la carga eléctrica o hidrofobicidad de la molécula en el área diana, o (c) la eficacia para mantener la mayor parte de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos según las propiedades generales de las cadenas laterales de la siguiente manera:
- 10 (1) hidrofobicidad: Norleucina, met, ala, val, leu, ile;  
(2) hidrofilicidad neutra: cys, ser, thr;  
(3) acidez: asp, glu;  
(4) basicidad: asn, gln, his, lys, arg;
- 15 (5) residuo que afecta a la orientación de la cadena: gly, pro; y  
(6) aromaticidad: trp, tyr, phe.
- 20 Se pueden realizar sustituciones no conservativas intercambiando un miembro de las clases anteriores por clases diferentes. Cualquier residuo de cisteína que no esté relacionado con el mantenimiento de la estructura tridimensional adecuada del péptido normalmente puede sustituirse por serina, aumentando por lo tanto la estabilidad oxidativa de la molécula e impidiendo una reticulación inadecuada. Por el contrario, se puede conseguir una mejora de la estabilidad añadiendo enlace(s) de cisteína al péptido.
- 25 25 Los tipos alterados de variantes de aminoácidos de péptidos son aquellos cuyo patrón de glucosilación de anticuerpos cambió. El término "cambio" en el presente documento se refiere a la deleción de al menos un residuo de carbohidrato que se encuentra en un péptido y/o la adición de al menos un residuo glicosilado que no existe dentro de un péptido.
- 30 30 La glucosilación en péptidos está habitualmente conectada a N o conectada a O. El término "conectado a N" en el presente documento se refiere a que los residuos de carbohidrato están unidos a la cadena lateral de residuos de asparagina. Como secuencias tripeptídicas, asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina (en donde X es cualquier aminoácido excepto prolina) son la secuencia de reconocimiento para unir enzimáticamente un residuo de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, con la presencia de una de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido, se crean los sitios de glucosilación potenciales. "glucosilación conectada a O" significa unir uno de azúcar N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a hidroxiaminoácidos. Los hidroxiaminoácidos son más habitualmente serina o treonina, pero pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.
- 35 40 La adición de un sitio de glucosilación a un péptido se realiza convenientemente cambiando la secuencia de aminoácidos para que contenga la secuencia tripeptídica mencionada anteriormente (para sitios de glucosilación unidos a N). Estos cambios se pueden realizar mediante la adición de al menos un residuo de serina o treonina a la primera secuencia del anticuerpo, o mediante sustitución con esos residuos (para sitios de glucosilación unidos a O).
- 45 Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 es seguro y tiene una eficacia excepcional como péptido de penetración celular. Por lo tanto, el péptido se puede conjugar con un fármaco para transportarlo dentro de la célula.
- En una realización de la presente invención, se proporciona un conjugado de un péptido y un principio activo que se va a transportar, en donde el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y el principio activo puede seleccionarse de proteínas, ácidos nucleicos, péptidos, minerales, azúcares, sustancias de contraste, fármacos y compuestos químicos. En una realización de la presente invención, los principios activos pueden ser péptidos. En

una realización de la presente invención, los principios activos pueden ser citocinas, anticuerpo, fragmentos de anticuerpo, enzimas terapéuticas, receptores solubles o ligandos.

- 5 Un péptido de penetración celular divulgado en el presente documento significa un péptido que puede transportar carga desde *in vitro* y/o *in vivo* al interior de la célula. Una "carga" divulgada en el presente documento comprende todas las sustancias que pueden transportarse dentro de la célula mediante conjugación con un péptido de penetración celular. Por ejemplo, todas las sustancias que desean aumentar la eficacia de penetración celular, específicamente fármacos, cosméticos o principios activos de alimento saludable, más específicamente sustancias que no pueden transportarse dentro de la célula a través de una vía general, más específicamente, azúcares,
- 10 nanopartículas, formulación biológica, virus, sustancias de contraste u otros compuestos químicos que pueden tener proteínas, ácidos nucleicos, péptido, minerales, glucosa como ejemplo, pero sin limitación a estos. Un "fármaco" divulgado en el presente documento es un concepto amplio que incluye una sustancia que se va a transportar para el alivio, profilaxis, tratamiento o diagnóstico de enfermedades, heridas o síntoma específico.
- 15 Un "péptido vehículo" divulgado en el presente documento es un péptido que puede transportar principios activos a un sitio diana mediante conjugación con principios activos.

En una realización de la presente invención, proteína o péptido como carga comprende una o más de hormona, análogo de hormona, enzima, inhibidores enzimáticos, proteínas (o péptidos) de transferencia de señales, anticuerpo y vacuna, pero sin limitación a estos. En una realización de la presente invención, un ácido nucleico es una molécula que puede ser moléculas de ADN o de ARN espontáneas o artificiales, monocatenarias o bicatenarias. La molécula de ácido nucleico puede ser uno o más ácidos nucleicos del mismo tipo (por ejemplo, que tienen la misma secuencia de nucleótidos) o ácidos nucleicos de diferentes tipos. Las moléculas de ácido nucleico comprenden uno o más ADN, ADNc, ADN señuelo, ARN, ARNip, miARN, ARNh, ARNm, ARNmc, ARNnop, ARNnp PNA, oligómero antisentido, plásmido y otros ácidos nucleicos modificados, pero sin limitación a estos. En una realización de la presente invención, virus comprende el virus completo o el núcleo del virus que incluye los ácidos nucleicos del virus. En una realización de la presente invención, una sustancia química es una indicación amplia que comprende una sustancia natural o sintética que puede actuar como fármaco.

- 30 Un fenómeno en el que la expresión específica del ADN está controlada por ARN bicatenario (ARNbc) en un proceso de expresión de ADN se denomina interferencia de ARN; ARNi. Desde que el fenómeno fue descubierto en *C. elegans* en 1998, se descubrió que el fenómeno es común en plantas, moscas de la fruta y mamíferos (Fire et al., *Nature*, 391:806-811, 1998; Novina y Sharp, *Nature*, 430:161-164, 2004).

35 La interferencia de ARN está mediada por ARNbc que tiene 19-25 pb que entra en las células, después de lo cual se combina con RISC (complejo silenciador inducido por ARN). La unión de la cadena antisentido del ARNbc a la secuencia de ARNm complementaria desencadena la degradación del ARNm diana por la enzima endonucleasa que se encuentra en el complejo RISC. (Rana, T M., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 8:23-36, 2007; Tomari, Y. y Zamore, P. D., Genes Dev., 19: 517-529, 2005). En otras palabras, El ARNip participa en la interferencia del ARN suprimiendo la producción de proteína específica e interfiriendo de ese modo con la expresión del ADN. ARNip que se compone de 19 ~ 23 nucleótidos, forma un par de bases de acuerdo con el orden complementario del ARNm para que el ARN mensajero específico (ARNm) forme ARN bicatenario. Después de eso, el ARN bicatenario se desintegra especialmente al mismo tiempo que el ARN mensajero se elimina de las células. El ARNip se ha destacado como sustancia para la terapia génica porque mostró un efecto excelente en la supresión de la expresión de ADN específico en estudios recientes con animales. ARNip con mayor activación y selección precisa de ADN, se ha estudiado durante los últimos 20 años y se espera que sustituya a los oligonucleótidos antisentido que se usan actualmente como remedio. Por lo tanto, muchas empresas farmacéuticas están desarrollando ahora un remedio basado en ARNip. En comparación con los oligonucleótidos antisentido existentes, se sabe que el ARNip inhibe la expresión genética con una cantidad 10 veces menor e inhibe los genes diana solo con una selectividad excelente de genes. La técnica de ARNip, especialmente para el fin del tratamiento, tiene una gran ventaja ya que puede diseñarse fácilmente en comparación con otros fármacos y tiene características como una alta selectividad diana e inhibición de la expresión genética específica. Además, dado que la supresión de la expresión génica mediante interferencia de ARN utiliza el mecanismo naturalmente presente *in vivo*, la toxicidad es baja. Sin embargo, el ARNip tiene la desventaja de que no puede transportarse fácilmente al interior de una célula, ya que no puede penetrar en la membrana celular porque es aniónico y se descompone fácilmente en un corto periodo de tiempo debido a su baja estabilidad *in vivo*. Esta desventaja del ARNip se puede resolver mediante conjugación con un péptido vehículo divulgado en el presente documento.

60 En una realización de la presente invención, la eficacia de principios activos, la carga, son células cancerosas, células inmunitarias o células de fibroblastos. Específicamente, las células cancerosas anteriores comprenden una célula cancerosa cualquiera seleccionada del grupo que consiste en: células de cáncer de hígado, células de cáncer de mama y células de leucemia, las células inmunitarias anteriores comprenden una célula inmunitarias cualquiera seleccionada del grupo que consiste en: linfocitos T, células B y monocitos.

- 65 En una realización de la presente invención, los principios activos anteriores deben localizarse en el citoplasma y el péptido vehículo transporta los principios activos anteriores al citoplasma localmente.

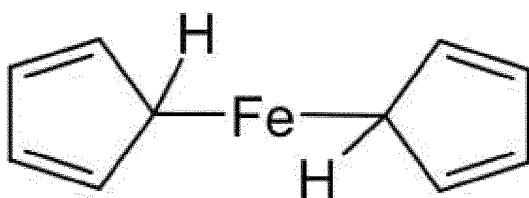
En una realización de la presente invención, los principios activos anteriores deben localizarse en la mitocondria, y el péptido vehículo transporta los principios activos anteriores a las mitocondrias localmente.

- 5 En una realización de la presente invención, los fármacos transportados dentro de la célula mediante un péptido de penetración celular pueden comprender uno o más transportadores de fármacos tal como liposoma, micela, nanopartículas, partículas magnéticas o puntos cuánticos.
- 10 El término "sustancia de contraste" divulgado en el presente documento es una indicación amplia que comprende todas las sustancias usadas para contrastar estructuras o fluidos dentro del organismo en la obtención de imágenes médicas. Una sustancia de contraste apropiada comprende un agente de contraste radiopaco, agente de contraste paramagnético, agente de contraste superparamagnético, TAC (tomografía computarizada) y otras sustancias de contraste, pero sin limitación a estos. Por ejemplo, un agente de contraste radiopaco (para obtención de imágenes de rayos X) comprenderá un compuesto de yodo inorgánico y un compuesto de yodo orgánico (por ejemplo, diatrizoato),
- 15 metales radiopacos y sus sales (por ejemplo, plata, oro, platino, etc.) y otros compuestos radiopacos (por ejemplo, sales de calcio, sal de bario tal como sulfato de bario, tantalio y tantalio oxidado). Una sustancia de contraste paramagnética apropiada (para la obtención de imágenes por RM) comprende ácido dietilentriaminopentaacético de gadolinio (Gd-DTPA) y sus derivados, otro complejo de gadolinio, manganeso, hierro, disprosio, cobre, europio, erbio, cromo, de níquel y cobalto, por ejemplo, ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,-N',N''-triacético (DO3A), ácido 1,4,7-triazacliclononano-N,N',N''-triacético (NOTA), ácido 1,4,8,10-tetraazaciclotetradecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (TETA), ácido hidroxibenciletilendiaminodiacético (HBED). Una sustancia de contraste superparamagnética apropiada (para la obtención de imágenes por RM) comprende magnetita, óxido de hierro superparamagnético (SPIO), óxido de hierro superparamagnético ultrapequeño (USPIO) y óxido de hierro monocristalino. Otras sustancias de contraste apropiadas son agentes de contraste de TAC yodados, no yodados, iónicos y no iónicos, una sustancia de contraste como marcador de espín o un agente eficaz en el diagnóstico.

- 30 Otros ejemplos de sustancias de contraste comprenden  $\beta$ -galactosidasa, proteína fluorescente verde, proteína fluorescente cian, luciferasa, pero sin limitación a estos, y un gen marcador que codifica una proteína que puede detectarse fácilmente cuando se expresa dentro de las células. Pueden usarse diversos marcadores tal como radionúclidos, harina, enzima, sustrato enzimático, cofactor enzimático, inhibidor enzimático, ligandos (especialmente hapteno).

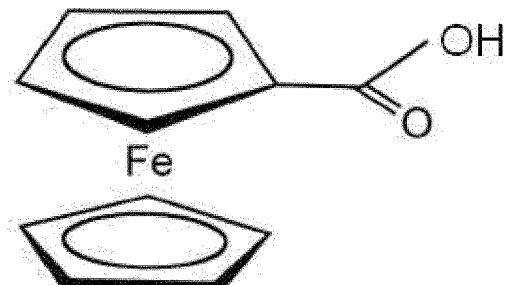
- 35 En un ejemplo de la presente invención, una sustancia de contraste es ácido ferrocenocarboxílico de la siguiente fórmula química 2. La estructura de ferroceno se muestra en la fórmula química 1.

[Fórmula Química 1]



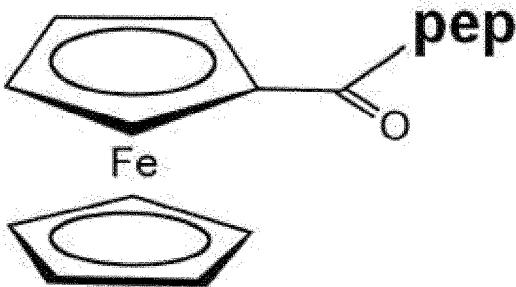
40

[Fórmula química 2]



- 45 En un ejemplo de la presente invención, un conjugado de péptido de penetración celular y una sustancia de contraste es ferrocenocarboxílico-pep1 que se muestra en la siguiente fórmula química 3.

[Fórmula química 3]



- 5 En una realización de la presente invención, un péptido o composición puede fusionarse con uno o más marcadores detectables. Los marcadores pueden ser compuestos que pueden detectarse en respuestas químicas, físicas o enzimáticas, o compuestos que generan señales directa o indirectamente en las respuestas. El marcado y la detección posterior se pueden realizar de acuerdo con el método conocido en la técnica (por ejemplo, Sambrook, J., y Russel, D.W. (2001); y Lottspeich, F., y Zorbas H. (1998) Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlín, Alemania). Los marcadores comprenden marcador fluorescente, marcador enzimático, marcador cromogénico, marcador luminiscente, marcador de radiación, hapteno, biotina, complejo de metal, metal y oro coloidal, pero sin limitación a estos. Todas las formas de estos marcadores son bien conocidas en este campo de trabajo, se pueden obtener comercialmente de varios proveedores.
- 10 15 En una realización de la presente invención, una carga se puede combinar directamente con el péptido. En otra realización de la presente invención, una carga se puede combinar con el péptido mediante varios tipos de enlaces, tal como enlaces covalentes o no covalentes. Una carga, por ejemplo, se pueden combinar con el extremo N o extremo C del péptido en una realización de la presente invención. Por ejemplo, una carga puede unirse al péptido mediante enlaces disulfuro o enlaces covalentes. Los enlaces covalentes son los enlaces que pueden unir una carga a una 20 amina  $\alpha$  de glutamato N-terminal o a una amina de residuos de lisina C-terminal. Además, un péptido y una carga se pueden combinar mediante un enlace no covalente, que puede tener un péptido o una carga y puede encapsular al otro en forma de cápsula.
- 25 En otra realización de la presente invención, un péptido se puede combinar con una carga mediante un enlazador. Por ejemplo, un péptido se puede combinar con una carga uniendo una carga a un enlazador después de introducir un enlazador tal como un enlazador Hynic (ácido 6-hidrazinopiridina-3-carboxílico), a la amina  $\alpha$  del glutamato N-terminal, o amina de los residuos de lisina C-terminal.
- 30 En otra realización de la presente invención, cuando una carga es ADN o ARN, el grupo SH (grupo tiol) se introduce en el péptido y el grupo maleimida se introduce en ADN o ARN, entonces, se combinan el grupo SH del péptido y el grupo maleimida del ADN o del ARN, creando así un enlace entre la carga y el péptido.
- 35 En otra realización de la presente invención, cuando una carga es un péptido o proteína, el ADN que expresa una carga se combina con ADN que expresa un péptido vehículo y, al expresarlo, una carga y un péptido se pueden combinar como una forma de proteína de fusión. Ejemplos específicos de combinación mediante una proteína de fusión son tal como sigue: cuando se fabrica un cebador para la producción de proteína de fusión, se une un nucleótido que codifica un péptido vehículo delante de un nucleótido que expresa una carga, y el nucleótido obtenido se inserta en un vector tal como el vector pET usando una enzima de restricción, y el nucleótido se expresa mediante transformación en una célula tal como BL-21 (DE3). En ese momento, una proteína de fusión debe expresarse eficazmente tratándola 40 con un agente inductor de la expresión como IPTG (isopropil-1-tio- $\beta$ -D-galactopiranósido). Después, la proteína de fusión expresada se purifica mediante purificación con etiqueta His, se dializa con PBS y se añade a un kit para concentrarla mediante centrifugación en dichas condiciones durante 5 a 20 minutos a 2000 a 4000 rpm.
- 45 En una realización de la presente invención, un péptido vehículo se combina con sustancias colorantes, sustancias fluorescentes, específicamente FITC (isotiocianato de fluoresceína) o GFP (proteína fluorescente verde). En una realización de la presente invención, FITC se combina con el grupo amino ( $\text{NH}^{3+}$ ) de lisina en el extremo N o extremo C de un péptido vehículo. En el caso de un péptido, donde lisina no existe en su extremo, el péptido se puede combinar con FITC mediante un enlazador que incluye lisina.
- 50 55 El péptido vehículo divulgado en el presente documento, que es el péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, se puede combinar con una carga en una fracción molar de 1:1, pero se puede combinar en una fracción molar distinta de 1:1. Por ejemplo, una fracción molar de CPP y una carga puede ser superior a 2:1, específicamente, más de 2:1, más de 3:1, más de 4:1, más de 5:1, más de 6:1, más de 7:1, más de 8:1, más de 9:1 o más de 10:1. Esto significa que se pueden combinar numerosas moléculas peptídicas vehículo con una molécula de carga. Las numerosas moléculas peptídicas vehículo se pueden combinar en serie o en paralelo. "Combinado en serie" significa que un péptido vehículo y una molécula de carga deben combinarse en los aminoácidos terminales.

- "Combinado en paralelo" significa que se van a combinar en un sitio distinto de los aminoácidos terminales. Por otro lado, la fracción molar de un péptido vehículo y una carga puede ser superior a 1:2. Esto significa que una molécula peptídica vehículo se puede combinar con un gran número de moléculas de carga. Por ejemplo, una fracción molar de un péptido vehículo y una carga puede ser 1:2, específicamente, más de 1:2, más de 1:3, más de 1:4, más de 1:5, más de 1:6, más de 1:7, más de 1:8, más de 1:9 o más de 1:10.
- Se puede encontrar fácilmente una ruta de movimiento del péptido combinado con isocianato de fluoresceína. Por lo tanto, en una realización de la presente invención se va a utilizar un péptido vehículo para la obtención de imágenes de células o la detección de una ruta de administración de fármacos dentro de una célula.
- En una realización de la presente invención, se prevé un uso del péptido como vehículo de administración de fármaco para transportar más de un principio activo a una célula *in vitro*, en donde el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. El uso puede indicar un uso terapéutico o no terapéutico.
- En una realización de la presente invención, un método para administrar fármacos dentro de una célula de un sujeto *in vitro* comprende una etapa de administrar una composición que comprende un fármaco; y se proporciona el péptido; en donde el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- En una realización de la presente invención, un conjugado es para su uso en un método para detectar la ruta de administración de fármacos que comprende una etapa de aplicar el conjugado del péptido y una sustancia de contraste a un sujeto; en donde el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- En una realización de la presente invención, se proporciona un kit para la administración de fármacos a una célula de un sujeto que contiene la composición y una instrucción, en donde la composición comprende un conjugado de la invención, en donde la instrucción incluye al menos una dosis de administración, vía de administración, frecuencia de administración e indicación de la composición.
- En otra realización de la presente invención, se proporciona una composición cosmética o alimentaria que comprende un conjugado de la invención.
- En una realización de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica, cosmética o alimentaria con una capacidad excepcional para transportar principios activos dentro de una célula, que comprende un conjugado de la invención.
- La mitocondria, como orgánulo central en el metabolismo energético de una célula eucariota, es el primer orgánulo intracelular conocido relacionado con enfermedades humanas (Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B: A case of severe hypermetabolism of non thyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study, J Clin Invest 41: 1776-804, 1962).
- Dado que las mitocondrias desempeñan un papel importante en el control del metabolismo energético de las células y la apoptosis, actúan como un diana principal para diversos fármacos terapéuticos. Además, este orgánulo participa en el control de la concentración de calcio dentro de la célula, la cadena respiratoria mitocondrial actúa como sistema de transporte de electrones que es importante en la producción de energía y provoca la producción de especies de oxígeno reactivas. Como resultado, la función mitocondrial anómala tiene una estrecha relación con enfermedades del adulto tal como diabetes, miocardiopatía, infertilidad, ceguera, enfermedades renales/hepáticas y accidente cerebrovascular (Modica-Napolitano KS, Singh KK: April mitochondria as targets for detection and treatment of cancer. Expert Rev Mol Med 11:1-19, 2002). Además, se sugiere que las mutaciones genéticas mitocondriales están implicadas en el inicio del envejecimiento, enfermedad neuronal degenerativa y cáncer, etc.
- Las "enfermedades relacionadas con las mitocondrias" divulgadas en el presente documento comprenden enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, MELAS (encefalomiopatía mitocondrial con acidemia láctica y episodios similares a accidentes cerebrovasculares), MERRF (mioclono, epilepsia y miopatía con fibras rojas rasgadas); NARP/MILS (debilidad muscular neurogénica, ataxia, retinitis pigmentosa/síndrome de Leigh de herencia materna); LHON (neuropatía óptica hereditaria de Leber); KSS (síndrome de Kearns-Sayre); PMPS (Síndrome de médula ósea-páncreas de Pearson); CPEO (oftalmoplejía externa progresiva crónica); síndrome de Reye; síndrome de Alper; síndrome de delección del ADNmt múltiple; síndrome de depleción del ADNmt; deficiencia del complejo I; deficiencia del complejo II (SDH); deficiencia del complejo III; deficiencia de la citocromo c oxidasa (COX, complejo IV); deficiencia del complejo V; deficiencia del translocador de nucleótidos de adenina (ANT); deficiencia de la piruvato deshidrogenasa (PDH); aciduria de ácido etilmalónico con acidemia de ácido láctico; aciduria de ácido 3-metilglutacónico con acidemia de ácido láctico; epilepsia refractaria que representa un deterioro durante la infección; síndrome de Asperger que representa un deterioro durante la infección; autismo que representa un deterioro durante la infección; trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH); parálisis cerebral que representa un deterioro durante la infección; alexia que representa un deterioro durante la infección; trombocitopenia de herencia materna; leucemia; MNGIE (miopatía mitocondrial, neuropatía periférica y autonómica, disfunción gastrointestinal y epilepsia); síndrome de MARIAHS (ataxia mitocondrial, infección recrudescente, afasia, hipouricemia/hipomielinización,

convulsiones y aciduria por ácido dicarboxílico); distonía de ND6; síndrome de vómitos cíclicos que representa un deterioro durante la infección; aciduria de ácido 3-hidroxiisobutírico con acidemia de ácido láctico; diabetes con acidemia de ácido láctico; síndrome neural reactivo a la uridina (URNS); necrosis estriatal bilateral familiar (FBSN); pérdida de audición relacionada con aminoglucósido; miocardiopatía relajada; linfoma de bazo; síndrome de Wolfram; síndrome de delección del ADN mitocondrial múltiple; y síndrome de acidosis tubular renal/diabetes/ataxia, pero sin limitación a estos.

También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos mencionados anteriormente. Las moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, tienen secuencias de bases de GAA GCG CGC CCG GCG CTG CTG ACC AGC CGC CTG CGC TTT ATT CCG AAA.

Los ácidos nucleicos pueden introducirse en la célula hospedadora de acuerdo con un método conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, los métodos conocidos pueden ser el método de transformación mediante el método de fosfato de calcio, liposoma, electroporación, poner en contacto un virus y una célula, o una microinyección directamente en la célula, etc. La célula hospedadora es una célula eucariota superior, por ejemplo, células de mamífero o células eucariotas inferiores, tal como una célula de levadura o células procariotas, tal como una célula bacteriana. Las células hospedadoras procariotas apropiadas para la transformación pueden ser las especies que pertenecen a *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y especies de microrganismos, como ejemplos.

El vector que incluye las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente es generalmente un vector de expresión recombinante y comprende, origen de replicación que permite una transformación de la célula hospedadora, y un marcador seleccionable (por ejemplo, dihidrofolato reductasa para cultivo de células eucariotas, o tolerancia a neomicina, tolerancia a tetraciclina o ampicilina en el gen TRP1 de *S. cerevisiae* o *E. coli*) y el promotor para controlar la transcripción de secuencias de recubrimiento de proteínas. Vectores de expresión disponibles son, por ejemplo, plásmidos bacterianos conocidos tal como SV40, derivados de pcDNA y plásmidos bacterianos conocidos tal como coIE1, pCR1, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX (Smith, et al., Gene 67:31-40(1988)), plásmidos tal como pMB9 y su derivado RP4, ADN de fago que es el mismo que numerosos derivados de fago I tal como NM989, ADN de fago tal como M13 y ADN de fago monocatenario de tipo filamentoso; plásmido de levadura, por ejemplo, ADN de fago o vector inducido a partir de una combinación de plásmido modificado para usar secuencias de supresión de expresión y ADN de fago. Los vectores de expresión de mamífero comprenden origen de replicación, un promotor apropiado y un potenciador. Además, pueden comprender sitios de unión a ribosomas obligatorios, sitios de poliadenilación, donante de corte y empalme y parte receptora, secuencias de terminación de la transcripción y secuencias no transcripcionales flanqueantes en 5'. Los vectores de expresión de mamífero pueden comprender un promotor inducible, por ejemplo, un vector que contiene promotor de dihidrofolato reductasa, cualquier vector de expresión que contiene un casete de expresión de DHFR o un vector de coamplificación de DHFR/metotrexato tal como pED. (Randal J, Kaufman, 1991, Randal J. Kaufman, Current Protocols in Molecular Biology, 16, 12(1991)). O se pueden usar vector de coamplificación de glutamina sintetasa/metionina sulfoxima, por ejemplo, pEE14 (Celltech), virus de Epstein-Barr (VEB), o un vector que dirige la expresión episomal bajo el control del antígeno nuclear (EBNA), por ejemplo, pREP4 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMEP4 (Invitrogen), pREP8 (Invitrogen), pREP9 (Invitrogen) y PEBVHis (Invitrogen). Vectores de expresión de mamífero seleccionables son Rc/CMV (Invitrogen) y pRc/RSV (Invitrogen), etc. Vectores de expresión de mamífero de virus vaccinia que pueden usarse en la presente invención son pSC11, pMJ601, pTKgptF1S, etc.

El sistema de vector de expresión de levadura que se va a usar en la presente invención es el vector pYES2 de no fusión (Invitrogen), pYESHisA de fusión, B, C (Invitrogen), vector pRS, etc.

Los vectores mencionados anteriormente pueden introducirse en diversas células, tal como células de mamífero, que son especialmente células derivadas de humano, o bacterias, levadura, hongos, insectos, nematodos y células vegetales. Los ejemplos de células apropiadas son la célula VERO, célula HELA, por ejemplo, ATCC N.º CCL2, línea celular CHO, por ejemplo, ATCC N.º CCL61, célula COS, por ejemplo, célula COS-7 y célula ATCC N.º CRL 1650, W138, BHK, HepG2, 3T3, por ejemplo, ATCC N.º CRL6361, A549, PC12, célula K562, célula 293, célula Sf9, por ejemplo, ATCC N.º CRL1711 y célula Cv1, tal como ATCC N.º CCL70, etc.

Otras células apropiadas que se van a usar en la presente invención son cepa de células hospedadoras procariotas, por ejemplo, las cepas pertenecientes a *E. coli* (por ejemplo, cepa DH5- $\alpha$ ), *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*.

En una realización de la presente invención, la composición puede contener de 0,1 µg/mg a 1 mg/mg, específicamente de 1 µg/mg a 0,5 mg/mg, más específicamente de 10 µg/mg a 0,1 mg/mg de un péptido que comprende SEQ ID NO: 1. Cuando el péptido está contenido en el intervalo mencionado anteriormente, toda la seguridad y estabilidad de la composición puede satisfacerse y ser apropiada en cuanto a la rentabilidad.

En una realización de la presente invención, la composición puede tener aplicación en todos los animales, incluyendo seres humanos, perro, pollo, cerdo, vaca, oveja, cobaya y mono.

En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica puede administrarse por vía oral, rectal,

- transdérmica, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, en la médula ósea, epidural o subcutánea.
- Las formas de administración oral pueden ser, pero sin limitación, comprimidos, píldoras, cápsulas blandas o duras, gránulos, polvos, solución o emulsión. Las formas de administración no oral pueden ser, pero sin limitación, 5 inyecciones, goteos, lociones, ungüentos, geles, cremas, suspensiones, emulsiones, suppositorio, parche o pulverización.
- En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica, si es necesario, puede contener aditivos, tal como diluyentes, excipientes, lubricantes, aglutinantes, disgregantes, tampones, dispersantes, tensioactivos, agentes 10 colorantes, sustancias aromáticas o edulcorantes. En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica puede fabricarse mediante métodos convencionales de la industria en la materia.
- En una realización de la presente invención, el principio activo de la composición médica puede variar de acuerdo con 15 la edad del paciente, sexo, peso, patología y estado, vía de administración o criterio del prescriptor. La dosificación basada en estos factores se determina dentro de los niveles de los expertos en la materia, y la dosis diaria, por ejemplo, puede ser, pero sin limitación, de 0,1 µg/kg/día a 1 g/kg/día, específicamente de 1 µg/kg/día a 10 mg/kg/día, más específicamente de 10 µg/kg/día a 1 mg/kg/día, más específicamente de 50 µg/kg/día a 100 µg/kg/día. En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica se puede administrar, pero sin limitación, de 1 a 3 veces al día.
- 20 En una realización de la presente invención, la composición cosmética se puede proporcionar en todas las formas apropiadas para aplicaciones tópicas. Por ejemplo, las formas pueden proporcionarse como soluciones, emulsiones obtenidas por dispersión de fase oleosa en agua, emulsión obtenida por dispersión de agua en fase oleosa, suspensión, sólido, gel, polvo, pasta, espuma o aerosol. Estas formas pueden fabricarse mediante métodos convencionales de la industria en la materia.
- 25 En una realización de la presente invención, la composición cosmética puede incluir, dentro de niveles que no dañan el efecto principal, otros ingredientes que pueden deseablemente aumentar el efecto principal. En una realización de la presente invención, la composición cosmética puede incluir adicionalmente hidratante, agentes emolientes, tensioactivos, absorbentes de UV, conservantes, fungicidas, antioxidantes, agente de ajuste del pH, pigmentos orgánicos o inorgánicos, sustancias aromáticas, agente refrescante o antitranspirante. Los expertos en la materia pueden decidir la relación de formulación de los ingredientes mencionados anteriormente dentro de niveles que no perjudiquen el propósito y los efectos de la presente invención, y la relación de formulación basada en el peso total de la composición cosmética puede ser 0,01 al 5 % en peso, específicamente del 0,01 al 3 % en peso.
- 30 En una realización de la presente invención, la composición de alimento no se limita en cuanto a formas, pero por ejemplo pueden ser formas de gránulos, polvo, líquidas y sólidas. Cada forma puede formarse con ingredientes comúnmente usados en la industria elegidos apropiadamente por los expertos en la materia, además del principio activo, y puede aumentar el efecto con otros ingredientes.
- 35 En una realización de la presente invención, la decisión sobre la dosificación del principio activo mencionado anteriormente está dentro del nivel de los expertos en la materia, y la dosificación diaria, por ejemplo, puede ser de 1 µg/kg/día a 10 mg/kg/día, más específicamente de 10 µg/kg/día a 1 mg/kg/día, más específicamente de 50 µg/kg/día a 100 µg/kg/día, pero no se limita a estos números y puede variar de acuerdo con la edad, el estado de salud, complicaciones y otros factores diversos.
- 40 Los términos usados en el presente documento pretenden usarse para describir las realizaciones, no para limitar la presente invención. Los términos sin números delante no limitan la cantidad sino que muestran que puede haber más de una cosa del término usado. La expresión "que incluye", "que tiene", "que consiste" y "que comprende" se interpretarán abiertamente (es decir, "que incluye, pero sin limitación").
- 45 La mención del intervalo de números se usa en lugar de indicar números separados dentro del intervalo, a menos que se indique explícitamente, cada número puede leerse como números separados integrados en el presente documento. Los valores de extremo de todos los intervalos están incluidos en el intervalo y pueden combinarse independientemente.
- 50 A menos que se indique lo contrario o se contradiga claramente en el contexto, todos los métodos mencionados en el presente documento se pueden realizar en el orden apropiado. El uso de una realización cualquiera y de todas las realizaciones, o lenguaje ilustrativo (por ejemplo., que use "como ~"), a menos que se incluya en las reivindicaciones, se usa para describir más claramente la presente invención, no para limitar el alcance de la presente invención.
- 55 Cualquier lenguaje en el presente documento fuera de las reivindicaciones no debe interpretarse como una necesidad de la presente invención. A menos que se definan de otra manera, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el significado comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.
- 60 Las realizaciones preferidas de la presente invención son el mejor modo conocido por los inventores para realizar la presente invención. Después de leer las declaraciones anteriores, puede resultar claro para los expertos en la materia
- 65 Las realizaciones preferidas de la presente invención son el mejor modo conocido por los inventores para realizar la presente invención. Después de leer las declaraciones anteriores, puede resultar claro para los expertos en la materia

las variaciones en las realizaciones preferidas.

**Ejemplo 1: Síntesis de péptido**

5 El péptido con SEQ ID NO: 1 se sintetizó de acuerdo con el método existente de síntesis de péptidos en fase sólida. De manera detallada, los péptidos se sintetizaron acoplando cada aminoácido desde el extremo C a través de la síntesis de péptidos en fase sólida Fmoc, SPPS, usando ASP48S (Peptron, Inc., Daejeon ROK). Aquellos péptidos con su primer aminoácido en el extremo C unido a resina se usaron de la siguiente manera:

- 10 resina de NH<sub>2</sub>-Lys(Boc)-2-cloro-trítilo  
 resina de NH<sub>2</sub>-Ala-2-cloro-trítilo  
 resina de NH<sub>2</sub>-Arg(Pbf)-2-cloro-trítilo

15 Todos los materiales de aminoácido para sintetizar el péptido se protegieron por Fmoc en el extremo N, y los residuos de aminoácido se protegieron por Trt, Boc, t-Bu (t-butiléster), Pbf (2,2,4,6,7-pentametil-dihidro-benzofuran-5-sulfonilo) que se puede disolver en ácido. Tal como:

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

25 Se usaron HBTU [hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio] / HOBr [N-hidroxibenzotriazol] / NMM [4-metilmorfolina]. En un 20 % de DMF, se usó piperidina para eliminar Fmoc. Con el fin de eliminar la protección del residuo o separar el péptido sintetizado de la resina, se usó cóctel de escisión [TFA (ácido trifluoroacético) / TIS (trisopropilsilano) / EDT (etanoloditiol) / H<sub>2</sub>O=92,5/2,5/2,5/2,5].

30 Los péptidos se sintetizaron usando el armazón de fase sólida añadiendo cada aminoácido con los procesos secuenciales de la siguiente manera; protección de aminoácido, reacción de acoplamiento, lavado, y desprotección.

35 Despues de cortar el péptido sintetizado de la resina, se purificó mediante HPLC y se verificó la síntesis por EM, y después se liofilizó.

El proceso de síntesis de péptidos específico se describe a continuación con el ejemplo de pep1 de SEQ ID NO: 1.

35 1) Acoplamiento

40 El aminoácido (8 equivalentes) protegido con resina de NH<sub>2</sub>-Lys(Boc)-2-cloro-trítilo se fundió en agente de acoplamiento HBTU (8 equiv.)/HOBr (8 equiv.)/NMM (16 equiv.), y tras la adición de DMF, la mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas, después se lavó secuencialmente con DMF, MeOH y DMF.

45 2) Desprotección de Fmoc

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

50 3) Preparar el armazón básico de péptido repitiendo las reacciones 1 y 2 repetidamente.

55 4) Escisión: Añadir cóctel de escisión al péptido completamente sintetizado y separar el péptido de la resina.

55 5) Añadir dietil éter previamente enfriado a la mezcla y luego centrifugar la mezcla de reacción para precipitar los péptidos.

55 6) Despues de la purificación por HPLC prep., comprobar el peso molecular por CL/EM y liofilizar para obtener los péptidos en forma de polvo.

**Ejemplo 2: Propiedad de penetración celular de un conjugado de CPP-FITC**

1. Síntesis de un conjugado

60 (1) Síntesis de un conjugado de FITC-CPP

65 Se fabricó un conjugado del péptido con SEQ ID NO: 1 combinado con FITC de la siguiente manera, por ejemplo, un conjugado de pep1 con SEQ ID NO: 1 y FITC, en otras palabras, FITC-enlazador-pep1 se fabricó de la siguiente manera.

65 El armazón básico de péptido, (resina de NH<sub>2</sub>-enlazador-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-

F-I-P-K(Boc)-2-cloro-trítilo) que se obtuvo de acuerdo con los métodos de fabricación descritos en el Ejemplo 1, se hizo reaccionar con FITC. Específicamente, se fundieron FITC (5-isotiocianato de fluoresceína) (8 equivalentes) y DIPEA (N,N-diisopropiletilamina) (16 equivalentes) en DMF. Se añadió la solución de DMF y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas, después se lavó secuencialmente con DMF, MeOH y DMF. Como resultado, se obtuvo resina de FITC-enlazador-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Boc)-2-cloro-trítilo. El enlazador en el presente documento es ácido 6-aminohexanoico, Ahx. Se añadió TFA/TIS/H<sub>2</sub>O=95/2,5/2,5 al péptido preparado sobre la resina y el conjugado se separó de la resina. A la mezcla obtenida se le añadió dietil éter previamente enfriado y se usó centrifugación para precipitar los conjugados peptídicos. Despues de purificación por HPLC prep., la pureza se confirmó con la HPLC analítica y el peso molecular se determinó mediante CL/EM. El péptido sintetizado como se describe anteriormente se verificó como FITC-pep1 mediante confirmación del peso molecular mediante CL/EM. Despues se liofilizaron los conjugados.

(2) Síntesis de un conjugado de CPP-FITC

El armazón básico del péptido, (resina de NH<sub>2</sub>-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Dde)-2-cloro-trítilo) se generó de acuerdo con los métodos de fabricación descritos en el Ejemplo 2 1. (1). Para introducir selectivamente FITC en el extremo C del péptido, el extremo N del péptido se protegió de Boc. Despues, el dicarbonato de di-terc-butilo (30 equivalentes) y DIPEA (30 equivalentes) se fundieron en DMF. La solución de DMF se añadió al péptido y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas, y el péptido se lavó secuencialmente con DMF, MeOH y DMF. Como resultado, se obtuvo resina de Boc-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Dde)-2-cloro-trítilo. Se usó hidrazina en un 2 % de DMF para eliminar Dde, que es el grupo protector del residuo C-terminal de Lys para añadir FITC al extremo C de Lys. Despues, se fundieron FITC (8 equivalentes) y DIPEA (16 equivalentes) en DMF que se añadió a la mezcla de reacción peptídica y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas, después se lavó secuencialmente con DMF, MeOH, DMF. Como resultado, se obtuvo resina Boc-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(FITC)-2-cloro-trítilo. Se añadió TFA/TIS/H<sub>2</sub>O=95/2,5/2,5 para separar el péptido de la resina. A la mezcla se le añadió dietil éter previamente enfriado y se usó centrifugación para precipitar los péptidos. Despues de purificación por HPLC prep., la pureza se confirmó con la HPLC analítica y el peso molecular se confirmó con CL/EM. Las sustancias obtenidas se verificaron como pep1-FITC mediante confirmación del peso molecular por CL/EM. Despues se liofilizaron los conjugados.

2. Experimento primario

(1) Cultivo celular

Se usaron las siguientes células y líneas celulares: CHO (línea celular de ovario de hámster chino), Huh7 (línea celular de carcinoma hepatocelular humano), HepG2 (línea celular de carcinoma hepatocelular humano), MCF7 (línea celular de adenocarcinoma de mama humano), COS7 (línea celular de fibroblastos de riñón de mono), Jurkat (línea celular de linfocitos T humanos), Raji (línea de células B humanas), THP1 (línea celular de monocitos humanos) y K562 (línea celular de leucemia humana), bmDC (células dendríticas derivadas de médula ósea) y células primarias derivadas del líquido sinovial y los tejidos sinoviales humanos.

Huh7, MCF7, Jurkat, Raji, THP1, K562 se cultivaron en medio RPMI 1640, células CHO en medio y células HepG2 en medio MEM. Los medios de crecimiento para todas las células se complementaron con suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen, EE. UU.), penicilina 100 ug/ml, 100 unidades/ml de estreptomicina y las células se cultivaron a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %.

Las bmDC se diferenciaron en células dendríticas en medio RPMI 1640 que contenía células obtenidas de médula ósea de ratón, GM-CS (20 ng/ml) e IL4 (20 ng/ml). 1x10<sup>6</sup> de las células se sembraron sobre una placa de 24 pocillos, el medio se reemplazó una vez cada 2 días y las células dendríticas maduras obtenidas el día 7 se usaron para el experimento.

Se prepararon PBMC (células mononucleares de sangre periférica) y linfocitos a partir de muestras de sangre humana (50 ml) recolectadas de sujetos sanos utilizando la solución separadora Biocoll (Biochrom AG, Berlín, Alemania).

HeLa se cultivaron en medio mínimo esencial (MEM) que contenía suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen, EE. UU.), sales de Earle, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y penicilina 100 µg/ml y 10 unidades/ml de estreptomicina y se cultivó a 37 °C, incubador de CO<sub>2</sub> al 5 %.

Todas las líneas celulares mencionadas anteriormente se adquirieron de ATCC (colección americana de cultivos tipo).

(2) Análisis de absorción de pep1-FITC in vitro

Se realizaron análisis de citometría de flujo y microscopía confocal para comparar el grado de absorción celular entre diferentes líneas celulares tratadas con pep1 (SEQ ID NO: 1) y el PTD previamente conocido, TAT (YGRKKRRQRRR) (SEQ ID NO: 10) de VIH.

### Citometría de flujo

- 5 Las células se cultivaron a 37 °C, incubador de CO<sub>2</sub> al 5 % y se hicieron crecer hasta una confluencia del 90~100 %. El medio se retiró y se lavó con PBS, se añadió 1 ml de OPTI-MEM a cada pocillo y se cultivó a 37 °C, incubador de CO<sub>2</sub> al 5 % durante una hora para la inanición celular. Después de lavar una vez con OPTI-MEM, las células se trataron con péptido en
- 10 OPTI-MEM (concentración de 100 µl) y FITC (concentración de 10 µM), se cultivaron a 37 °C, incubador de CO<sub>2</sub> al 5 %. Despues de retirar el medio, las células se lavaron con 1 x PBS tres veces y se recogieron usando Trisina/EDTA. La absorción celular de FITC y el resto del péptido conjugado con FITC se comparó y analizó con células no tratadas como control.
- 15 Como resultado, se confirmó que pep1 tiene una mejor capacidad de penetración celular que TAT, conocido como péptido de penetración celular. Especialmente, la capacidad de penetración celular fue mejor cuando FITC se conjuguó con un residuo de lisina en el extremo C.

### Análisis de microscopía confocal

- 20 Las células se sembraron en portaobjetos de 2 pocillos (NUNC, Lab-Tek), que han crecido hasta alcanzar una confluencia del 50 % en un medio que contenía suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen, EE. UU.), penicilina 100 ug/ml, 100 unidades/ml de estreptomicina y se cultivaron a 37 °C, incubador de CO<sub>2</sub> al 5 % durante 12 horas.
- 25 Despues de retirar el medio, las células se lavaron con PBS y Starvedin 1 ml de OPTI-MEM durante una hora. Se añadieron cincuenta µl de péptido combinado con FITC (5 µM) en cada cámara y se cultivaron a 37 °C, incubador de CO<sub>2</sub> al 5 % durante 2 horas. Despues de retirar el medio, las células se lavaron con PBS tres veces y se fijaron durante 20 minutos en 0,5 ml de paraformalehído al 4 % a temperatura ambiente. PFA al 4 % se lavó rápidamente con PBS dos veces. El núcleo de la célula se tiñó con 500 nM de yoduro TO-PRO®-3 642/661 nm (Invitrogen) durante 10 min a temperatura ambiente.
- 30 Despues, las células se lavaron tres veces con 1xPBS, se retiró la cámara de plástico, se colocó un cubreobjetos de espesor n.º 1,5 en un portaobjetos despues de dejar caer el medio de montaje VECTASHIELDFX (laboratorios Vector) sin burbujas. Se preparó una muestra aplicando esmalte de uñas transparente al borde del cubreobjetos. La muestra se almacenó a 4 °C en la oscuridad antes de observarla con un microscopio de fluorescencia y se analizó mediante un sistema de exploración láser confocal. En el análisis se usó un microscopio confocal de barrido más grande FV1000 (Olympus).

#### (i) ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas)

- 40 Las células se trataron con pep1, se lavaron 2 veces con 1xPBS y se resuspendieron con el tampón de lisis que contenía Tris 50 mm, pH 7,5, EDTA 10 mM, pH 8,0, PMSF 1 mM, NaF 2 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, NP 40 al 0,1 %, aprotinina 100 g/µl. Despues, las células suspendidas se sonicaron dos veces durante 15 segundos usando el procesador Sonicator Ultrasonic, Misonix, NY, EE. UU.) y, se obtuvo sobrenadante (lisado celular) por centrifugación a 4 °C, 13.000 rpm durante 10 minutos. La concentración de proteína se determinó usando
- 45 ensayo de proteínas Bradford (Bio-Rad, EE. UU.) y ELISA de fluorescencia.

### 3. Experimento secundario

#### 50 (1) Propiedad de penetración celular en la línea celular HeLa

- Se realizaron análisis de citometría de flujo y microscopio confocal para comparar el grado de absorción celular del dominio de transducción de proteínas previamente conocido, TAT (YGRKKRQRRR) de VIH; en donde las células se trataron con un conjugado de pep1 y FITC preparado a partir del Ejemplo 2.1.
- 55 La línea celular se dividió en una placa de 6 pocillos y se cultivó en un medio que contenía suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen, EE.UU.), penicilina 100 ug/ml, 100 unidades/ml de estreptomicina a 37 °C, incubador de CO<sub>2</sub> al 5 % durante 12 horas. Despues de lavar la línea celular con PBS, se indujo la inanición en un Medio Mínimo Esencial durante una hora. Se trataron 20 uM de cada péptido vehículo y se cultivaron a 37 °C durante una hora.
- 60 Despues de repetir la etapa de lavar las células con PBS tres veces, se trató tripsina-EDTA durante 10 minutos a 37 °C para separar el péptido vehículo en el exterior de la célula, las células se recogieron con PBS refrigerado y se realizó una centrifugación para repetir la etapa de lavar las células tres veces. Despues de eso, las células se suspendieron en 0,5 ml de PBS que contenía paraformaldehído al 4 % y se analizó la fluorescencia de las células usando FACS Calibur (Becton Dickinson). El aspecto de absorción celular del control y varios péptidos combinados con FITC se comparó y analizó mediante MFI (intensidad media de fluorescencia).

- La línea celular cultivada se dividió en pocillos de cámara y se cultivó en un medio que contenía suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen, EE. UU.), penicilina 100 µg/ml y estreptomicina 100 unidades/ml a 37 °C, incubador de CO<sub>2</sub> al 5 % durante 12 horas. Después de lavar las células con PBS, se indujo la inanición en Medio Esencial Mínimo durante una hora. Se trataron 10 µM de cada péptido y se cultivaron a 37 °C durante una hora. Después de repetir la etapa de lavar las células con PBS 3 veces, las células se fijaron a temperatura ambiente durante 15 minutos con paraformaldehído al 2 % (v/v). El núcleo se tiñó con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a temperatura ambiente y las células se compararon y analizaron mediante análisis con microscopio confocal. El resultado es el mismo que se muestra en la figura 7.
- 5      Por otro lado, para analizar la viabilidad y toxicidad celular, la línea celular cultivada anterior se dividió en una placa de 96 pocillos y se cultivó en un medio que contenía suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen, EE. UU.), penicilina 100 µg/ml y 100 unidades/ml de estreptomicina a 37 °C, incubador de CO<sub>2</sub> al 5 % durante 12 horas. Después de lavar las células con PBS, se indujo la inanición en Medio Esencial Mínimo durante una hora. Se trataron y cultivaron 20 µM de cada péptido vehículo durante 24 horas a 37 °C. La viabilidad celular y la toxicidad se analizaron mediante el método de ensayo MTT. El resultado es el mismo que se muestra en la figura 8.
- 10     15

#### **(2) Análisis de citometría de flujo de la propiedad de penetración celular en la línea celular Huh7**

- Para investigar la propiedad de penetración celular de PEP1, la citometría de flujo se realizó en la línea celular Huh7 tratada con PEP1. Los métodos analíticos usados fueron los mismos que los descritos anteriormente (1) análisis de la línea celular HeLa. El resultado mostró que la propiedad de penetración celular de PEP1 era inferior que la de TAT pero mayor que la del control. (figura 9 y figura 10)
- 20     25

#### **(3) Propiedad de penetración celular de pep1 en linfocitos T humanos**

- Para investigar la propiedad de penetración celular de PEP1, el péptido se trató en linfocitos T humanos y se realizó FACS (clasificación celular activada por fluorescencia) como análisis de citometría de flujo. El método analítico usado fue el mismo que el descrito anteriormente (1) análisis de la línea celular HeLa. El resultado mostró que pep1 tiene una propiedad de penetración celular 25 veces mayor que la del FITC de control y 6 veces mayor que la del TAT derivado del VIH. (figura 11 y figura 12)
- 30     35

#### **(4) Citometría de flujo y análisis con microscopio confocal de la propiedad de penetración celular de PEP1 dependiendo de la ubicación de la síntesis de FITC**

- Para investigar la propiedad de penetración celular de PEP1 en varias líneas celulares, la citometría de flujo y el análisis con microscopio confocal se realizaron utilizando un conjugado de PEP1 combinado con FITC en N y extremo C del péptido. El método analítico usado fue el mismo que el descrito anteriormente (1) análisis de la línea celular HeLa. Las líneas celulares usadas fueron Huh7, HepG2, CHO, bmDC. El resultado mostró que PEP1 combinado con FITC en el extremo C tenía una propiedad de penetración celular de aproximadamente, 3 a 10 veces mayor que el otro. Además, cuando se observó con microscopio de fluorescencia, PEP1 combinado con FITC en el extremo C tenía una mayor propiedad de penetración celular para penetrar en el citoplasma que PEP1 combinado con FITC en el extremo N. (Figura 14)
- 40     45

#### **(5) Análisis de microscopio confocal de la propiedad de penetración celular de PEP1 y TAT en varias líneas celulares**

- Se realizó un análisis de microscopio confocal para mostrar la diferencia entre el péptido TAT y PEP1 en términos de absorción dentro de la célula en cada línea celular (MCF7, Huh7, HepG2). La figura 15 y la figura 16 son diagramas que representan resultados analíticos. Verde (488 nm) representa FITC; las partes rojas teñidas con TOPRO-3 representan el núcleo de una célula. El núcleo se designó en rojo para mostrar la colocalización del núcleo y el péptido. En el diagrama, cuando se mostró la localización, se representó como naranja combinado con verde y rojo. El resultado mostró que la parte del núcleo, tratada con TAT y representada como naranja, fue donde tuvo lugar la colocalización del péptido y el núcleo de la célula. A diferencia de esto, no había ninguna parte de la célula representada en naranja en el núcleo tratado con PEP1.
- 50     55

- Estos resultados significan que PEP1 y TAT se absorben en la célula en diferentes ubicaciones. La figura 17 es un gráfico digitalizado de la absorción de PEP1 y TAT.

- Todos los diagramas analíticos de microscopio confocal fueron producidos por el microscopio confocal de barrido FV1000 (Olympus). El significado del coeficiente de Pearson para colocalización se presenta en el diagrama. En cada línea celular MCF7, Huh7, HepG2, la región de interés (ROI) fue designada para mostrar la dispersión media del coeficiente de Pearson. En todas las líneas celulares, el valor P fue inferior a 0,0001. A través de esto, se verificó que TAT estaba localizado en el núcleo mientras que PEP1 permanecía en el citoplasma sin localizarse en el núcleo. Como esto, las características de PEP1 donde estaba localizado dentro del citoplasma, fue lo más importante que diferencia a PEP1 de los péptidos de penetración celular existentes, incluido TAT.
- 60     65

**Ejemplo 3: Propiedad de penetración celular de PEP1 dependiendo de diferentes condiciones ambientales**

(1) Citometría de flujo de la propiedad de penetración celular de PEP1 dependiendo de la concentración y el tiempo en diversas líneas celulares

5 La propiedad de penetración celular de PEP1 se investigó tratando PEP1 con varias líneas celulares dependiendo de las concentraciones y el tiempo. Los métodos analíticos específicos siguieron los métodos descritos en el Ejemplo 2. El resultado mostró que la propiedad de penetración celular de PEP1 tenía una tendencia a aumentar en todas las líneas celulares tal como Huh7, bmDC (líneas celulares dendríticas derivadas de Golgi de ratón), CHO, COS7 dependiendo 10 de las concentraciones, como TAT. En el caso de la línea celular HepG2, la propiedad de penetración celular de TAT se aumentó mientras que la de PEP1 se disminuyó a una concentración de 50  $\mu$ M. A diferencia de otras líneas celulares, en la línea celular MCF, la propiedad de penetración celular de PEP1 aumentó 4 veces más que la de TAT y también aumentó dependiendo de las concentraciones (figura 18 a figura 23). Al observar la propiedad de penetración 15 celular del péptido dependiendo del tiempo, la propiedad de penetración celular se aumentó en líneas celulares Huh7, MCF7 y HeLA. Especialmente, en la línea celular MCH7 cuando se trataron 5  $\mu$ M del péptido, la propiedad de penetración celular se aumentó 10 veces más en todos los tiempos (figura 24 a figura 26)

(2) Citometría de flujo y análisis de microscopio confocal de la propiedad de penetración celular de PEP1 dependiendo 20 de la concentración, temperatura y tiempo en una línea celular Enriquecida

20 Jurkat (línea de células T humanas), THP1 (línea de células mononucleares humanas), Raji (línea de células B humanas), línea celular K562 (línea celular de leucemia humana) se usaron como línea celular Enriquecida para tratar el péptido dependiendo de las concentraciones, la temperatura y el tiempo y analizar la propiedad de penetración celular del péptido. El resultado mostró que en la línea celular Jurkat y THP1, la propiedad de penetración celular de PEP1 fue de 1,5 a 2 veces mayor que la de TAT, mientras que en la línea celular Raji y la línea celular K562, TAT mostró una mayor propiedad de penetración celular que PEP1. Dependiendo de concentraciones del péptido, la propiedad de penetración celular mostró una tendencia a aumentar en todas las líneas celulares. Dependiendo del tiempo, la propiedad de penetración celular se incrementó continuamente más de 3 veces, pero la propiedad de penetración celular del péptido se disminuyó con el tiempo en la línea celular THP1. No hubo diferencias en la 30 propiedad de penetración celular de PEP1 en todas las líneas celulares dependiendo de la temperatura. Estos resultados verificaron que PEP1 tenía una mayor propiedad de penetración celular en las líneas celulares Jurkat y THP1.

(3) Análisis de citometría de flujo de la propiedad de penetración celular de PEP1 dependiendo de la concentración, la 35 temperatura y el tiempo en PBMC humanas

Se usaron PBMC separadas de sangre humana para tratar el péptido dependiendo de las concentraciones, la temperatura y el tiempo y analizar la propiedad de penetración celular del péptido. El resultado mostró que, en la PBMC completa, PEP1 mostró una propiedad de penetración celular 1,4 veces mayor que TAT y las propiedades de 40 penetración celular tanto de TAT como de PEP1 aumentaron dependiendo de las concentraciones y el tiempo. En linfocitos, se mostró que la propiedad de penetración celular de PEP1 aumenta 1,8 veces, en monocitos, la propiedad de penetración celular de PEP1 fue similar a la de TAT. Dependiendo de las concentraciones, la propiedad de penetración celular de PEP1 se aumentó tanto en los linfocitos como en los monocitos. Dependiendo del tiempo, la propiedad de penetración celular de PEP1 mostró una tendencia a aumentar tanto en linfocitos como en monocitos, 45 pero especialmente la propiedad de penetración celular de los monocitos se aumentó hasta las 3 horas como TAT pero a las 5 horas, se incrementó más del 20 % en comparación con TAT. (Figura 32 a Figura 34)

(4) Citometría de flujo del péptido mediante tratamiento químico en PBMC humanas y Jurkat

50 Con PBMC separadas de sangre humana, se realizó un análisis de utilización de tratamiento químico para verificar un mecanismo de penetración celular. La concentración del tratamiento químico se decidió basándose en los datos notificados en JBC (278(36), 34141-34149 en 2013. OPTI-MEM se trató con un tratamiento químico y se lavó con PBS una hora antes de que se tratara el péptido PEP1 y se realizará el análisis de citometría de flujo.

55 El resultado mostró que en la PBMC completa, cuando MatCD (extracción de colesterol de membrana plasmática), tratada con PEP1, la propiedad de penetración celular tenía a suprimirse y otros tratamientos químicos mostraron una tendencia similar. A diferencia de esto, la propiedad de penetración celular de TAT se aumentó en todas las líneas celulares. En la línea celular Jurkat, MatCD mostró una tendencia a suprimir la propiedad de penetración celular. Todo 60 el tratamiento químico mostró una tendencia a suprimir PEP1 sin tener ningún efecto sobre TAT. Esto verificó que PEP1 se translocó a través de la membrana plasmática en PBMC y Jurkat. (Figura 35 a Figura 36)

(5) Análisis de la propiedad de penetración celular de PEP1 usando varios anticuerpos

65 El hecho de que HSP70/90 desempeña un papel importante en la propiedad de penetración celular de Pep1 se analizó usando el anticuerpo HSP70/90. Anticuerpos de GAPDH, HSP70, HSP90 y enolasa se trataron en PBMC separadas de sangre humana, linfocitos y Jurkat para realizar citometría de flujo. Se usaron como control anticuerpos de GAPDH

y enolasa. Cuando los anticuerpos suprimieron la combinación y la interacción entre pep1 y HSP70/90, la propiedad de penetración celular de pep1 se redujo notablemente y esto respaldó el hecho de que HSP70/90 desempeña un papel importante en la propiedad de penetración celular de PEP1.

- 5 Para comparar y analizar la propiedad de penetración celular del péptido usando varios anticuerpos, se usaron anticuerpos frente a HSP70, enolasa, GAPDH (Santacruz), HSP90. Las células se trataron con heparina (10 µg/ml), metil beta-ciclodextrina (5 mM), nocodazol (20 µM), brefeldina A (10 µM), citocalasina F (5 µM) o cloroquina (100 µM) una hora antes de que el péptido cultivara las células. Después de eso, las células se lavaron con PBS, el tratamiento de péptido se realizó mediante análisis de citometría de flujo como el mismo método descrito en el Ejemplo 2. Se 10 adquirieron anticuerpos anti-HSP70, anti-enolasa y anti-GAPDH de Santacruz y el anticuerpo anti-HSP90 se adquirió de Abcam. Para analizar el papel de cada proteína en la penetración en las células, las células se trataron con anticuerpos correspondientes a las proteínas con el mismo método.

Como se muestra en la figura 37, cuando las células se trataron con anticuerpos específicos de HSP79 y HSP90, la absorción de GV1001-F en hPBMC se redujo notablemente. Por otro lado, se descubrió que no hubo ningún efecto sobre la absorción de pep1-F cuando las células se trataron con anticuerpos específicos de GAPDA o enolasa.

Además, parecía que la propiedad de penetración celular del péptido TAT no se veía afectada cuando las células se trataron con anticuerpos específicos de HSP70 y HSP90 y esto verificó que HSP70 y HSP90 desempeñan un papel específico en la penetración de GV1001 en el citoplasma de una célula. Se mostraron resultados similares cuando se realizaron experimentos con THP-1, linfocitos humanos y células Jurkat.

Se ha informado de sobreexpresión de HSP90 y HSP70 (expresión de ADN y proteínas) en varios cánceres. Por lo tanto, pep1 puede arrastrar cargas hacia las células de manera más eficiente en las células cancerosas que en las células normales y, por lo tanto, se puede sugerir que pep1 tiene la capacidad de atacar específicamente las células cancerosas donde HSP70 o HSP90 están sobreexpresados.

#### Ejemplo 4: Propiedad de penetración celular de un conjugado de ferrocenocarboxílico-CPP

- 30 1. Fabricación de un conjugado de ferrocenocarboxílico-Cpp

El aminoácido (8 equivalentes) protegido con resina de NH<sub>2</sub>-Lys(Boc)-2-cloro-trítilo y agente de acoplamiento HBTU (8 equivalentes)/HoBt (8 equivalentes)/NMM (16 equivalentes) se fundieron en DMF para el acoplamiento. Se añadió la solución de DMF, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas, después se lavó con DMF, MeOH, DMF en ese orden. 35 Despues de eso, se añadió piperidina al 20 % en DMF para la desprotección de Fmoc y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 5 minutos, 2 veces, después se lavó con DMF, MeOH, DMF en ese orden. Al repetir las reacciones anteriores, el armazón básico de péptido, se preparó resina de NH<sub>2</sub>-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Dde)-2-cloro-trítilo. Se añadió hidrazina en un 2 % de DMF para retirar Dde, que es el grupo protector de los residuos de Lys C terminal. Despues de eso, se fundieron 40 ácido ferrocenocarboxílico (Sigma Aldrich n.º de cat. 46264, 16 equivalentes) y agente de acoplamiento HBTU (16 equivalentes)/HoBt (16 equivalentes)/NMM (32 equivalentes) en DMF. Se añadió la solución de DMF, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas, después se lavó con DMF, MeOH y DMF en ese orden. Se añadió TFA/TIS/H<sub>2</sub>O = 95/2,5/2,5 a la resina peptídica sintetizada anteriormente para separar el péptido de la resina. Se añadió dietil éter enfriado a la mezcla obtenida y se usó centrifugación para precipitar los péptidos reunidos. El 45 precipitado se purificó por HPLC y se confirmó con EM. Despues, los péptidos se liofilizaron.

#### 2. Penetración de células madre neuronales

50 Se extrajo la corteza de la cabeza de un embrión de rata que había estado preñada durante 13 días (Sprague-Dawley, SD) (Orient bio, Kyungki, Corea) y las células se dividieron con 2 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup> en una placa recubierta con poli-L-ornitina/fibronectina en PBS libre de Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> (GIBCO, Grand Island, NY, EE. UU.). Más del 95 % de las células madre neuronales se obtuvieron a 37 °C, entorno con CO<sub>2</sub> al 5 % después de 4 a 6 días mediante tratamiento del medio N2 (DMEM/F12, insulina 4,4 IM, transferencia de 100 mg/l, selenita 30 nM, putrescina 0,6 IM, progesterona 20 nM, ácido ascórbico 0,2 mM, L-glutamina 2 nM, D(+)-glucosa 8,6 mM, NaHCO<sub>3</sub> 20 nM (Sigma, St. Louis, MO)) 55 diariamente con 10 ng/ml de BFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básicos).

Las células madre neuronales obtenidas anteriormente se dividieron en una placa de cámara con 1x10<sup>5</sup>. Las células de la placa se trataron con 10 µM de ferrocenocarboxílico-pep1 y se cultivaron a 37 °C, incubador de CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células se lavaron con PBS dos veces y se fijaron con paraformaldehído al 4 % a temperatura ambiente durante 20 minutos. El núcleo de las células se tiñó con medio de montaje DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (medio de montaje con DAPI) (Vector Laboratories, CA, EE. UU.). Despues de eso, las células se compararon y analizaron mediante un sistema de exploración con láser confocal a una longitud de onda azul de 430-500 nm, una longitud de onda roja de 620-700 nm y una longitud de onda combinada de rojo y azul.

- 65 Los resultados se muestran en la figura 38 y la figura 39.

La figura 38 es un diagrama que representa el estado de células madre neuronales a lo largo del tiempo después de ser tratadas con ferrocenocarboxílico-pep1.

Como se muestra en la figura 38, el resultado del análisis mostró que 10  $\mu\text{M}$  de ferrocenocarboxílico-pep1 penetraron en la célula a partir de 2 horas y que con el tiempo penetraron grandes cantidades de células en la célula.

La figura 39 es un diagrama que representa el estado de penetración de células madre neuronales tomadas por el sistema de exploración con láser confocal; en donde las células madre neuronales se trataron con ferrocenocarboxílico-pep1 y el núcleo de las células se teñió con DAPI. En la Figura 39, la parte representada en azul a una longitud de onda de 430-550 nm es el núcleo teñido con DAPI y la parte representada en rojo a una longitud de onda de 700 nm es ferrocenocarboxílico-pep1. Como se muestra en el diagrama de una longitud de onda de combinación del rojo y el azul, ferrocenocarboxílico-pep1 está agrupado alrededor del núcleo y esto muestra que ferrocenocarboxílico-pep1 penetró en la célula y se translocó al citoplasma.

### 15 3. Evaluación de toxicidad

Para la evaluación de la toxicidad del propio pep1 que se conjugó con ácido ferrocenocarboxílico, las células madre neuronales se dividieron con  $4 \times 10^4$  y  $2,5 \times 10^5$  en una placa de 96 pocillos y 24 pocillos respectivamente, y se cultivaron durante al menos 12 horas a 37 °C, incubador de CO<sub>2</sub> al 5 %. Diferentes concentraciones (0, 0,01, 0,1, 1, 10, 100  $\mu\text{M}$ ) de ferrocenocarboxílico-pep1 se trataron y cultivaron durante 24 horas, seguido de evaluaciones de viabilidad y toxicidad celular utilizando el ensayo del kit de recuento celular-8 (CCK-8) y ensayos de activación de lactato deshidrogenasa (LDH). El resultado se muestra en la Figura 40.

Como se muestra en la figura 40, se verificó que no hubo ningún efecto sobre la viabilidad y toxicidad celular de las células madre neuronales a cada concentración (0, 0,01, 0,1, 1, 10, 100  $\mu\text{M}$ ).

### 4. Experimento *in vivo*

#### A. Preparación de células madre neuronales

5x10<sup>6</sup> de células madre neuronales obtenidas en el experimento anterior (2), se dividieron en una placa de 100 mm. Se trataron y cultivaron 10  $\mu\text{M}$  de ferrocenocarboxílico-pep1 a 37 °C, incubador de CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 horas y las células se separaron de la placa TrypLE (GIBCO) y se lavaron con medio libre. Se prepararon 10  $\mu\text{l}$  de 3x10<sup>5</sup> células madre neuronales marcadas con ferrocenocarboxílico-pep1 por cabeza.

#### B. Trasplante de células madre neuronales tratadas con ferrocenocarboxílico-cpp

Todos los experimentos con animales divulgados en el presente documento se realizaron después de recibir la aprobación de IACUC de la Universidad de Hanyang, Corea. Se adquirieron ratas SD de 8 semanas y tras un periodo de adaptación de una semana, en el experimento se usaron ratas de 290 g ± 15 g de peso corporal. Los experimentos se realizaron con animales de 4 grupos diferentes, por ejemplo, NSC con grupo de ferrocenocarboxílico-pep1, NSC sin grupo de ferrocenocarboxílico-pep1, grupo de ferrocenocarboxílico-pep1 y grupo de solución salina. Al trasplantar células, ferrocenocarboxílico-pep1 o solución salina a cada grupo, fueron trasplantados dentro del cerebro de ratas SD usando cirugía estereotáctica. Antes del trasplante, se anestesiaron ratas con ketamina y rompun, y se extrajeron las partes del cráneo triturando el cuero cabelludo después del afeitado. Se trasplantaron estereotácticamente ferrocenocarboxílico-pep1 o solución salina en una coordenada de AP = +0,7, R = +2, V+ -5,5.

#### C. Obtención de imágenes por RM

Se usó la obtención de imágenes de RM para observar las NSC trasplantadas y ferrocenocarboxílico-pep1 *in vivo*. Se realizó la obtención de imágenes de RM 3 días después del trasplante y se usó RM Best 3T de Philips. Se usaron ketamina y rompun para anestesiar ratas y la obtención de imágenes por RM se realizó usando una secuencia de pulsos recuperada de gradiente multiplanar (TR = 596 ms, TE = 16 ms, espesor de la sección = 0,7 mm, resolución en el plano: 292 x 290  $\mu\text{m}$  (tamaño de resolución 0,0593 mm<sup>3</sup>), y número de adquisiciones = 1.

Los resultados se muestran en la figura 41 a la figura 44. La figura 41 es una imagen de RM que representa un cerebro al que se trasplantaron células madre con el grupo de ferrocenocarboxílico-pep1 y la figura 42 es una imagen de RM que representa el cerebro al que se trasplantaron células madre sin ferrocenocarboxílico-pep1. La figura 43 es una imagen de MR que representa un cerebro cuyo grupo de ferrocenocarboxílico-pep1 fue trasplantado y la figura 44 es una imagen de MR que representa un cerebro cuyo grupo salino fue trasplantado. Como se muestra en la figura 41 a la figura 44, la detección de células madre neuronales tratadas con ferrocenocarboxílico-pep1 es excepcional en comparación con las células madre neuronales no tratadas con ferrocenocarboxílico-pep1. Por otro lado, la detección de un cerebro con un grupo de ferrocenocarboxílico-pep1 trasplantado (figura 43) fue excelente en comparación con la detección de un cerebro donde se trasplantó grupo salino (figura 44).

#### Ejemplo 5: Propiedad de penetración celular de PEP1 para transportar macromoléculas (proteínas, ADN y

ARNip)

1. Propiedad de penetración celular del conjugado de CPP-GFP

5 (1) Fabricación del conjugado de CPP-GFP

Se fabricó un conjugado de un péptido de SEQ ID NO: 1 y proteína fluorescente verde tal como sigue.

10 En primer lugar, como se muestra en la Figura 45, se produjeron cebadores para clonar proteínas fluorescentes verdes (SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7) en vector pET28a(+) (Promega). El cebador se produjo para tener el sitio de restricción EcoRI en 5', sitio de restricción HindIII en 3', se añadieron 21 pb de secuencias 전반부 de GFP junto a la parte del sitio de restricción EcoRI, se añadió un codón de terminación junto a la parte del sitio de restricción HindIII. Para la producción de ADN de proteína GFP-CPP, el 5' se produjo igual que GFP y el frente de GFP se produjo para tener secuencias que codifican CPP. Por ejemplo, en el caso del péptido de SEQ ID NO: 1, fue producido para tener las siguientes secuencias: GAA GCG CGC CCG GCG CTG ACC AGC CGC CTG CGC TTT ATT CCG AAA (SEQ ID NO: 3). Ejemplos para la comparación, para producir TAT-GFP, las siguientes secuencias; TAT GGT CGT AAA AAA CGT CAA CGT CGT CGT (SEQ ID NO: 11), se añadieron al frente de GFP.

20 EGFP se obtuvo mediante PCR usando como molde el vector representado como diagrama en la figura 45. Al producir un cebador, 16p está unido al frente de EGFP en un caso de EGFP-16p (GAA GCG CGC CCG GCG CTG CTG ACC AGC CGC CTG CGC TTT ATT CCG AAA). En un caso de EGFP-TAT, TAT se produce en el frente de EGFP cuando se produce un TAT cebador.

25 Cuando se expresa el cebador en E. coli, 16P y TAT se modifican para el uso de codones de E. coli.

25 La figura 46 es un diagrama mimético que representa el vector pET-28a. La figura 47 es un diagrama mimético de clonación.

30 El cebador directo se produjo añadiendo 21 secuencias de GFP detrás de las secuencias codificantes de CPP y el cebador inverso se produjo añadiendo partes de secuencias C-terminales de GFP, usando el cebador anterior y el vector pET-28a-GFP como molde, y se realizó la PCR. La PCR se realizó a 95 °C, 5 min, 30 ciclos, 95 °C, 5 min (desnaturalización), 63 °C, 30 s (hibridación), 72 °C, 7 min y se usaron 10 pmol de cada cebador. Fragmentos de GFP, ADN de GFP-CPP se amplificaron en las condiciones de PCR anteriores y los fragmentos se clonaron en la parte de EcoRI e HindIII del vector pET28a(+) y se obtuvo el vector que expresa GFP, GFP-CPP. (Figura 47)

35 35 La proteína se separó transformando el vector anterior en bacterias. Específicamente, BL21 (DE3) de E.coli (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) se transformó con cada uno de los vectores anteriores y se cultivó en 5 ml de LB/Kanamicina y se trasladó a 100 ml de medio y se cultivó en el medio. Se añadió kanamicina en una relación de volumen de 1/1000. El vector se cultivó con centrifugación a 37 °C durante 2 a 3 horas y se cultivó hasta un intervalo de 0,6-0,8 midiendo la absorbancia y se trató con 10 mM de IPTG (isopropil beta-D-1-tiogalactopiranósido). El vector se cultivó durante 3~4 horas adicionales y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos. (Figura 48)

40 45 El principio de tratamiento de IPTG 1 mM en el presente documento es tal como sigue. Las condiciones de tratamiento son que antes de tratar IPTG, el transformante BL-21 (100 ml) se cultivó a 37 °C durante 2~3 horas con una D.O. de aproximadamente 0,6-0,8 y se extrajo la proteína. En el caso de EGFP-TAT, después del tratamiento con IPTG, EGFP-TT estuvo a 16 °C durante la noche. La proteína purificada se puede obtener a partir de la muestra usando el método de purificación de etiqueta His. (Figura 49)

50 50 El resultado de la centrifugación de la proteína expresada mostró que la sobreexpresión de la proteína representada en verde se puede confirmar visualmente. La proteína sobreexpresada se separó usando un kit de separación de proteínas (Prod. n.º 21277, Thermo Scientific, IL, EE. UU.), kit de purificación de etiquetas His, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

55 55 Después de la separación, las proteínas se dializaron, purificaron y concentraron. Específicamente, las proteínas se purificaron usando PBS esterilizado a 4 °C. En primer lugar, la bolsa de diáisis se equilibró con PBS, la solución de proteína separada anteriormente se añadió a la bolsa con una jeringa de 5 ml y se dializó a 4 °C mediante agitación. Para aumentar la concentración de proteínas y eliminar sustancias innecesarias, las proteínas dializadas se concentraron mediante centrifugación a 3.000 rpm a 4 °C en BIBASPIN 20 (Prod. n.º VS2092, Sartorius Stedim Biotech, Alemania).

60 60 (2) Cultivo de línea celular

65 65 Se dividieron 5x10<sup>5</sup> de la línea celular en una placa de 6 pocillos usando células HepG2 (células de carcinoma hepatocelular humano) obtenidas de ATCC y se cultivaron en medio MEM que contenía suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen, EE. UU.), penicilina 100 µg/ml, 100 unidades/ml de estreptomicina a 37 °C, incubador de CO<sub>2</sub> al 5 % durante 12 horas. Cada línea celular CHO (células de ovario de hámster chino), HeLa (células de cáncer del cuello

uterino humano), Huh7 (células de carcinoma hepatocelular humano), MCF7 (células de cáncer de mama humano) se cultivó en cada medio MEM RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen, EE. UU.), L-glutamina 2 mmol/ml, penicilina 100 µg/ml y 100 unidades/ml de estreptomicina a 37 °C, incubador de CO<sub>2</sub> al 5 %.

5 (3) Microscopio de fluorescencia

Después de lavar la línea celular con PBS, se indujo la inanición durante una hora en OPTI-MEM. 1 uM de GFP (SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7), TAT (YGRKKRRQRRR)-GFP (fabricado en el Ejemplo 5.1(1)), pep1-GFP (fabricado en el Ejemplo 5.1(1)) se trataron y cultivaron a 37 °C, incubador de CO<sub>2</sub> al 5 % durante 18 horas. Después de lavar la línea celular con PBS, las células se observaron a 488 nm y se dividieron en 1 ml de PBS. El análisis de microscopio de fluorescencia mostró la penetración de TAT en la célula y la localización en el núcleo y la localización de pep1 en el citoplasma. El resultado confirmó que pep1 tiene una mayor propiedad de penetración celular en la línea celular MCF que TAT y después de la penetración de la célula; pep1 se localizó en el citoplasma. (Figura 50)

15 (4) Citometría de flujo

Después de lavar la línea celular con PBS, se indujo la inanición durante una hora en OPTI-MEM. 1 uM de GFP, TAT-GFP y 16mer-GFP se trataron y cultivaron a 37 °C, incubador de CO<sub>2</sub> al 5 % durante 2 horas. Después de repetir la etapa de lavado con PBS 3 veces, las líneas celulares se suspendieron en 0,5 ml de tampón FACS 1X y se analizó su fluorescencia con FACS Calibur (Becton Dickinson). Aspectos de absorción celular de GFP, TAT-GFP y pep1-GFP se compararon y analizaron con líneas celulares no tratadas como control. Se trató GFP combinada con pep1 con varias líneas celulares y se realizó citometría de flujo. El resultado mostró que la absorción celular de pep1 se aumentó más de 2 veces que TAT en la línea celular MCF7, pero en otras líneas celulares, la absorción celular de pep1 no fue mayor que la de TAT. (Figura 51)

25 2. Propiedad de penetración celular del conjugado de ADN

(1) Fabricación de ADN (polilisina)-CPP

30 Los péptidos con propiedad de penetración celular previamente conocida (GGG, TAT) y péptido derivado de la telomerasa, hTERT, se combinaron con lisina de 15-meros. Los cationes abundan en la polilisina y, por lo tanto, se combinan bien con el ADN aniónico. La síntesis de péptidos fue realizada por Peptron, el péptido sintetizado se diluyó con agua destilada con una concentración de 1 mg/ml. La figura 52 representa la estructura primaria del péptido usado en el experimento.

35 La figura 53 es un diagrama mimético del péptido usado en el experimento.

(2) Cultivo de línea celular

40 Cada CHO (células de ovario de hámster chino), HeLA (células de cáncer del cuello uterino humano), Huh7 (células de carcinoma hepatocelular humano), La línea celular MCF7 (células de cáncer de mama humano) se cultivó en medio DMEM, MEM y RPMI 1640 respectivamente que contenía suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen, EE. UU.), L-glutamina 2 mmol/ml, penicilina 100 µg/ml y 100 unidades/ml de estreptomicina a 37 °C, incubador de CO<sub>2</sub> al 5 %.

45 (3) Electroforesis en gel

Para investigar el grado de combinación del complejo ADN-péptido, se mezclaron 0,05-5 ug de péptido y 0,5 ug de escalera de ADN Generuler de 1 kb (Fermentas) y se dejaron en espera a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se inyectó el complejo ADN-péptido en un gel de agarosa al 1 % que contenía 0,5 mg/ml de bromuro de etidio (EtBr) y se hizo reaccionar a 100 v en tampón TAE 1x durante 30 minutos.

50 El resultado de la electroforesis del complejo péptido-ADN mostró que todos los péptidos se combinaron bien con el ADN (figura 54). Cuando los péptidos y el ADN están bien combinados, la inmovilización del ADN tiene lugar a medida que se neutraliza el ADN. De acuerdo con el resultado de este experimento, la inmovilización se observó cuando (p/p) es mayor que 1.

55 (4) Análisis de la capacidad de transporte de luciferasa utilizando el péptido pep1.

60 5 x 10<sup>4</sup> ~ 1 x 10<sup>5</sup> de la línea celular especificada anteriormente se cultivó en cada pocillo de una placa de 12 pocillos y se lavó con PBS y el medio se colocó con OPTI-MEM. El vector pIRE2-EGFP se produjo insertando ADN de luciferasa en el vector OPTI-MEM y pIRE2-EGFP. Se mezclaron 2 ug de vector de luciferasa pIRE2-EGFP con 1, 2, 4, 8 múltiplos (p/p) de cada péptido y se produjo el complejo de 100 ul/pocillo de volumen total. El complejo ADN-péptido producido se insertó en cada pocillo y se cultivó a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 4 horas. Después de lavar las células, el medio se reemplazó por medio completo y se cultivó a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 20 horas adicionales.

65 El medio se retiró 24 horas después de la inyección del complejo ADN-péptido y después de lavar las células con PBS dos veces, se inyectaron 50 ul de tampón de lisis en cada pocillo. El ensayo de luciferasa se realizó en lisado celular

obtenido a partir de agitación celular durante 15 minutos a temperatura ambiente. La luminiscencia se midió añadiendo 100 ul de sustrato de luciferasa a 20 ul de lisado celular. El resultado registró el valor promedio estandarizado por el ensayo de BSA.

5 El resultado del análisis de luciferasa verificó que hTERT-pk mostró una mayor expresión de luciferasa que los grupos de control (TAT-pK, GGG-pK) en todas las concentraciones. Especialmente, a una concentración de 8 veces en comparación con ADN, hTERT-pk mostró un nivel significativo de expresión de luciferasa en comparación con TAT-pK y GGG-pK. (Figura 55)

10 3. Propiedad de penetración celular de ARNip-CPP

(1) Fabricación de conjugado ARNip-CPP

15 El armazón básico del péptido, La resina de Trt-mercaptopropionil-Ahx-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Boc)-2-cloro-trítilo se fabricó de acuerdo con los métodos de fabricación descritos en el Ejemplo 1. Ahs en el presente documento significa ácido 6-aminohexanoico. La síntesis de la resina de Trt-mercaptopropionil-Ahx-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Boc)-2-cloro-trítilo fabricada se verificó mediante HPLC y análisis de masas.

20 El conjugado SiLuc-pep1 se fabricó mediante conjugación de secuencias de ARNip con pep1 sintetizado anteriormente. Específicamente, las secuencias de ARNip usadas en conjugación con pep1 son las siguientes.

SiLuc sentido (5'-> 3'): CUUACGCUGAGUACUUCGA (dTdT) (SEQ ID NO: 4)

25 SiLuc antisentido (5'->3'): UCGAAGUACUCAGCGUAAG (dTdT) (SEQ ID NO: 5)

El método de fabricación es que SiLuc modificado con maleimida (75 umol) suministrado por Bionia, Corea se fundió en tampón PBS (1 x 1 ml) y se conjugó haciendo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. La conjugación se realizó haciendo reaccionar el grupo tiol del péptido y la maleimida de ARNip. La reacción de conjugación se verificó usando reactivo de Ellman y ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobencenoico o DTNB). El reactivo de Ellman es un producto químico usado para cuantificar la concentración o el número de grupos tiol en una muestra.

30 Las secuencias de ARNip usadas en el experimento son para fines de ADN de luciferasa y ARNip de pep1 codificado por SiLuc [conjugación de siLuc con mercaptopropionil-Ahx-LRALPKRPFISRLTEA], siLuc-Tat(47-57) [conjugación de siLuc con mercaptopropionil-Ahx-YGRKKRRQRRR], siLuc-Penetratina [conjugación de siLuc con mercaptopropionil-Ahx-RQIKIWFQNRRMKWKK], siLuc-pep1 [conjugación de siLuc con mercaptopropionil-Ahx-EARPALLTSRLRFIPK] proporcionado por Peptron donde se solicitó la síntesis de péptidos.

35 pep1 codificado con siOCont, siCont-Tat (47-57), siCont-Penetratina, siCont-pep1 se usaron como control. ARNip de luciferasa y ARNip negativo (n.º de cat.: SN-1012, ARNip de control negativo AccuTarget) que se venden comercialmente por Bionia se usaron como control positivo y control negativo respectivamente.

40 Las secuencias de ARNip son las siguientes.

45 SiLuc sentido (5'-> 3'): CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT (SEQ ID NO: 4)  
SiLuc antisentido (5'->3'): UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT (SEQ ID NO: 5)

Las secuencias de siCont son las siguientes.

50 siCont sentido (5'->3'): GCACCUUAUAAACGGUAGdTdT (SEQ ID NO: 8)  
SiCont antisentido (5'->3'): CUACCGUUGUUAUAGGUGCdTdT (SEQ ID NO: 9)

(2) Cultivo de línea celular

55 Se cultivaron células Huh7 (carcinoma hepatocelular humano) obtenidas de ATCC en un medio RPMI 1640 (Hyclon) que contenía suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, EE.UU.), L-glutamina 2 mmol/ml, 100 ug/ml de penicilina y 100 unidades/ml de estreptomicina a 37 °C, incubador de CO<sub>2</sub> al 5 %.

60 (3) Ensayo de luciferasa

65 Se insertaron 2x10<sup>5</sup> células Huh7 en cada pocillo de una placa de 24 pocillos y se cultivaron. La transfección transitoria de las células se realizó usando 2 ug de ADN objetivo de luciferasa y lipofectamina 2000 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, EE. UU.). Después de 4 horas, se lavó lipofectamina 2000 perfectamente con PBS varias veces; se trató ARNip de concentración final de 400 nm en 500 ul de Opti-MEM (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, EE. UU.) y se hizo reaccionar en un incubador a 37 °C durante 16 horas. Para terminar la reacción, las células se lavaron con PBS y las proteínas se lisaron usando tampón de lisis Reporter (Progema Co., Madison, WI, EE. UU.) y la luminiscencia se midió con un

luminómetro (Turner BioSystem, Sunnyvale, CA, EE. UU.) usando reactivo de luciferasa (Promega Co., Madison, WI, EE. UU.). La eficacia del ARNip se corrigió mediante el ensayo de proteínas de Bradford.

Para verificar la propiedad de penetración celular de pep1, se produjo ARNip para la luciferasa y se midió la activación de la luciferasa usando células Huh7 (carcinoma hepatocelular humano) y una línea celular CHO. El resultado verificó que la activación de penetratina y pep1 en ARNip combinado con luciferasa se redujo aproximadamente un 28 %, un 20 % en comparación con penetratina y pep1 en ARNip combinado con control en la línea celular Huh. A diferencia de esto, no se observó ninguna diferencia significativa en la activación cuando se codificó y TAT en ARNip que se combinó con luciferasa y control. Además, al comparar la activación de luciferasa entre Tat y se codificaron combinados con luciferasa y ARNip de penetratina y pep1, se observó un 27%, 55 %, 40% de supresión de la activación respectivamente (figura 57)

A diferencia del otro ARNip, ARNip conjugado con pep1 mostró aproximadamente un 30 % de inhibición de la actividad luciferasa en célula CHO. Por lo tanto, la capacidad de penetración celular de pep1 podría confirmarse observando la actividad de inhibición de luciferasa usando ARNip. (Figura 58).

#### (4) Análisis de citometría de flujo sobre la capacidad de transporte de ARNip

Las secuencias de ARNip usadas en el experimento se dirigen a ADN de HBx y siHBV combinado, sentido-5' GAG GAC UCU UGG ACU CUC A dTdT-3' (SEQ ID NO: 3), antisentido-5' UGA GAG UCC AAG AGU CCU C dTdT-3')3' (SEQ ID NO: 13) con fluoresceína. La síntesis de ARNip se realizó por BIONEER, Corea, y el ARNip sintetizado se purificó mediante HPLC.

Se cultivaron  $1 \times 10^5$  de HepG2 en cada pocillo de una placa de 24 pocillos un día antes y el medio se reemplazó con Opti-MEM. 4 horas después del cultivo celular, se añadió ARNip marcado con FITC (siHBV) y el péptido de cada relación molar y se mezcló con 300  $\mu$ l de Opti-MEM para producir el complejo. Se insertó ARNip para tener una concentración final de 10 uM y se cultivó a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante una hora. Se trató tripsina y estuvo en espera a temperatura ambiente durante 5 minutos y se lavó con PBS tres veces. Se inyectaron 500  $\mu$ l de tampón FACS en cada pocillo y se retiraron las sustancias fluorescentes distintas de las células repitiendo la centrifugación tres veces a 300 rpm y 4 °C. Se midió un total de 10.000 células de fluorescencia de FITC mediante citometría de flujo (sistema BD FACSCalibur; Becton Dickinson, Francia). El resultado del análisis de absorción celular mediante citometría de flujo verificó que hTERT-pk mostró una absorción celular de ARNip marcado con FITC 2,5 veces mayor que el grupo de control (RGD-pK, GGG-pK) en una concentración superior a una relación molar de 20 (figura 56).

#### 35 Ejemplo 6: Capacidad de transporte local de conjugado CPP-FITC a la mitocondria

##### 1. Análisis de microscopio

###### (1) Cultivo de línea celular

40 Se usó la línea celular adherente MCH7 (adenocarcinoma de mama humano) obtenida de ATCC. La línea celular se cultivó en un medio RPMI 1640 (Sigma) que contenía suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen, EE. UU.), penicilina 100  $\mu$ g/ml, 100 unidades/ml de estreptomicina a 37 °C, incubador de CO<sub>2</sub> al 5 %.

45 Se fabricó un conjugado de FITC combinado con el extremo C de péptido (SEQ ID NO:1) como se describe en el Ejemplo 2 anterior.

###### (2) Análisis de microscopio confocal

50 La línea celular anterior se dividió para ocupar el 50 % de la superficie del deslizador de 2 cámaras (NUNC, Lab Tek) y se cultivó a 37 °C, incubador de CO<sub>2</sub> al 5 % durante 12 horas. El medio se retiró después y se lavó con PBS una vez y se cultivó en 1 ml de OPTI-MEM (Sigma) durante una hora y se indujo la inanición. Se añadieron 100 uM de un conjugado cuyo FITC se combinó con el extremo C del péptido (SEQ ID NO: 1) a cada cámara para obtener 50  $\mu$ l (10  $\mu$ M) y se cultivó a 37 °C, incubador de CO<sub>2</sub> al 5 % durante 2 horas.

55 Después se retiró el medio y se lavó con PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4) tres veces. En cada cámara, se añadieron 0,5 ml de parafomadehído (PFA) al 4 % y se fijó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las células se lavaron con 1xPBS y se lavaron dos veces rápidamente con PFA al 4 %.

60 Las células anteriores se trataron con 500 nM de yoduro TO-PRO-3 642/661 nm (Invitrogen) y se tiñeron los núcleos de las células a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las mitocondrias se tiñeron con 250 nM de mototracker deep red FM 644/655 nm (Invitrogen) después de tratarlas a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se retiró la solución y las células se lavaron con 1 x PBS tres veces y se retiró la cámara de plástico. Después de retirar la cámara, se añadió por goteo medio de montaje VECTASHIELD (Vector Laboratories) sobre un portaobjetos, se cubrió el portaobjetos y se realizó un sistema de exploración con láser confocal evitando la luz. Se midió FITC a una longitud de onda de 488 nm con yoduro TO-PROR-3 (Invitrogen) y mototracker® deep red (Invitrogen) se midió a una longitud de

onda de 633 nm.

Los resultados se muestran en la figura 59. Los resultados de teñir un conjugado con FITC combinado en el extremo C del péptido (SEQ ID NO: 1) y marcadores de localización de mitocondrias, mototracker® deep red FM 644/655 nm (Invitrogen), son (A) Tratamiento único de un conjugado con FITC combinado en el extremo C del péptido (SEQ ID NO: 1) en células MCF, (B) tratamiento único del marcador de localización mitocondrial, mototracker deep red FM 644/665 nm (Invitrogen) (c) Contraste de fases de las células, (D) Combinación de imágenes de A y B. Con estos resultados, se

5 puede verificar que el péptido derivado de la telomerasa se localiza dentro de las mitocondrias.

10 2. Combinación de anticuerpos

Un conjugado pep-GFP fabricado de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 5. 1(1), se trató en  $2 \times 10^7$  de la  
15 línea celular adherente MCF7 (adenocarcinoma de mama humano) obtenida de ATCC y la transferencia Western se realizó con anticuerpo anti-hsp70 mitocondrial. Después del tratamiento de GFP solo, tratamiento de 11mer-GFP, tratamiento de ccg-GFP y el análisis de transferencia Western con anticuerpo frente a hsp70 se realizaron como ejemplos de comparación. Específicamente, el análisis de transferencia Western se realizó como el método que se describe a continuación.

20 Se prepararon  $2 \times 10^7$  de línea celular MCF y se separaron las mitocondrias usando el kit de separación mitocondrial (Themo science, n.º 89874) de acuerdo con el protocolo correspondiente. Específicamente, se añadieron 800 ul de reactivo A al sedimento celular y se agitó con vórtex a una velocidad media durante 5 segundos. Después de eso, las células se colocaron en hielo durante 2 minutos y la suspensión celular se trasladó a un triturador de tejidos Dounce y la suspensión se trituró en hielo. Después las células lisadas se trasladaron al tubo original.

25 Se añadieron 800 ul de reactivo C al tubo original y se enjuagó el producto triturado con 200 ul de reactivo A. Después de mezclar suavemente, se centrifugaron 700 g de células durante 10 minutos. El sobrenadante se trasladó a un nuevo tubo de ensayo y se centrifugó nuevamente a 3000 g durante 15 minutos. El sobrenadante se desecharó y se añadieron 500 ul de reactivo C al sedimento que contenía mitocondrias y se centrifugó a 12.000 g durante 5 minutos. El sobrenadante se desecharó y el residuo se colocó en hielo. 100 ul de tampón producido añadiendo CHAPS al 2 % a TBS (Tris 25 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,2) se agitaron con vórtex durante un minuto. El tampón se centrifugó a 12.000 g durante 2 minutos, la proteína mitocondrial soluble se inmunoprecipitó con proteínas de prueba como se muestra a continuación.

30 35 Las proteínas de prueba son conjugado pep1-GFP fabricados como se describe en el Ejemplo 5. 1(1), GFP, 11mer-GFP, ccg-GFP se usaron como control. 11mer-GFP es un conjugado de proteína de 11-meros combinada con GFP en donde la proteína de 11-meros se compone de 11 aminoácidos derivados de VHB. Ccg es el origen de replicación del virus de la hepatitis B.

40 Para unir cada una de las proteínas de prueba anteriores y la proteína de control a la resina, se preparó resina de cobalto marcada con 6xHis (Prod. n.º 89964, Thermo Scientific, UL, EE. UU.). Se añadieron 50-100 µl de la resina a una columna y se lavaron con 500 µl de tampón de lavado cinco veces. Cada proteína de expresión se añadió a la columna, se dejó mezclando a 4 °C durante 30 min a 1 hora. Después de eso, Se lavaron 500 µl de polímero de proteína de expresión-resina con tampón de lavado 5 veces. El sobrenadante de mitocondrias preparado anteriormente se añadió en este caso y se dejó durante la noche a 4 °C con agitación. Al día siguiente, la resina se lavó con el mismo método, la resina se eluyó añadiendo 200 µl de tampón de elución. El resultado se muestra en la figura 60. El resultado verificó que el anticuerpo frente a hsp70 de mitocondria combina solo con pep1-GFP.

## REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de un péptido vehículo de penetración celular y un principio activo,
- 5 en donde el péptido vehículo consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y en donde el principio activo se selecciona de una proteína, un ácido nucleico, un péptido, un mineral, un azúcar, una nanopartícula, un producto biológico, un agente de contraste, un fármaco y un compuesto químico, en donde el péptido vehículo y el principio activo se combinan a través de un enlace covalente a través del extremo C del péptido vehículo.
- 10 2. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el principio activo es
  - a) un ADN o un ARN, en donde el péptido vehículo se conjuga con ADN a través de polilisina cuando el principio activo es un ADN;
  - 15 b) una proteína o un péptido, opcionalmente una citocina, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, enzima terapéutica, receptor soluble o ligando.
- 20 3. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido vehículo y el principio activo se combinan a través de un enlace covalente, mediado selectivamente por un enlazador.
4. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido vehículo se combina con isoftiocianato de fluoresceína o proteína fluorescente verde (GFP).
- 25 5. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el principio activo es un agente de contraste.
6. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el agente de contraste se selecciona del grupo que consiste en un agente de contraste radiopaco, agente de contraste paramagnético, agente de contraste superparamagnético y agente de contraste para TAC.
- 30 7. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el agente de contraste es a base de hierro, opcionalmente un carboxilato de ferroceno.
8. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, para su uso en la obtención de imágenes de una célula, opcionalmente una célula madre.
- 35 9. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el péptido vehículo se mueve localmente hacia el citoplasma y desempeña un papel de entrega citoplasmática local del principio activo, opcionalmente, en donde el péptido vehículo se mueve localmente hacia una mitocondria y desempeña un papel de entrega mitocondrial local del principio activo.
- 40 10. Una composición que comprende el conjugado de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a la reivindicación 9, que es una composición farmacéutica, una composición cosmética o una composición de alimento saludable.
- 45 11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno canceroso o inmunitario.
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, para su uso en la modulación de la actividad mitocondrial en un método de tratamiento o profilaxis de síntomas de una enfermedad o trastorno relacionado con las mitocondrias y seleccionado del grupo que consiste en enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, MELAS (encefalomiopatía mitocondrial con acidemia láctica y episodios similares a accidentes cerebrovasculares); MERRF (mioclonia, epilepsia y miopatía con fibras rojas rasgadas; NARP/MILS (debilidad muscular neurogénica, ataxia, retinitis pigmentosa/síndrome de Leigh de herencia materna); LHON (neuropatía óptica hereditaria de Leber); KSS (síndrome de Kearns-Sayre); PMPS (Síndrome de médula ósea-páncreas de Pearson); CPEO (oftalmoplejía externa progresiva crónica); síndrome de Reye; síndrome de Alper; síndrome de delección del ADNmt múltiple; síndrome de delección del ADNmt; deficiencia del complejo I; deficiencia del complejo II (SDH); deficiencia del complejo III; deficiencia de la citocromo c oxidasa (COX, complejo IV); deficiencia del complejo V; deficiencia del translocador de nucleótidos de adenina (ANT); deficiencia de la piruvato deshidrogenasa (PDH); aciduria de ácido etilmalónico con acidemia de ácido láctico; aciduria de ácido 3-metilglutacónico con acidemia de ácido láctico; epilepsia refractaria que representa un deterioro durante la infección; síndrome de Asperger que representa un deterioro durante la infección; autismo que representa un deterioro durante la infección; trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH); parálisis cerebral que representa un deterioro durante la infección; alexia que representa un deterioro durante la infección; trombocitopenia de herencia materna; leucemia; MNGIE (miopatía mitocondrial, neuropatía periférica y autonómica, disfunción gastrointestinal y epilepsia); síndrome de MARIAHS (ataxia mitocondrial, infección recrudesciente, afasia, hipouricemia/hipomielinización, convulsiones y aciduria por ácido dicarboxílico); distonía de ND6; síndrome de vómitos cíclicos que representa un deterioro durante la infección; aciduria de ácido

3-hidroxiisobutírico con acidemia de ácido láctico; diabetes con acidemia de ácido láctico; síndrome neural reactivo a la uridina (URNS); necrosis estriatal bilateral familiar (FBSN); pérdida de audición relacionada con aminoglucósido; miocardiopatía relajada; linfoma de bazo; síndrome de Wolfram; síndrome de delección del ADN mitocondrial múltiple; y síndrome de acidosis tubular renal/diabetes/ataxia,

- 5 en donde el péptido vehículo es un péptido vehículo que se mueve localmente hacia una mitocondria y desempeña un papel de entrega mitocondrial local del principio activo, y  
en donde el principio activo es un ingrediente para el tratamiento, profilaxis, la supresión de la progresión o el alivio de síntomas de la enfermedad o el trastorno relacionado con mitocondrias.
- 10 13. Un método para administrar un principio activo a una célula, opcionalmente a mitocondrias dentro de una célula, en donde el método comprende una etapa de administrar un conjugado de un péptido vehículo de penetración celular y un principio activo a una célula *in vitro*, en donde el péptido vehículo es un péptido de penetración celular que realiza la administración del principio activo a la célula y comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 15 14. El método de la reivindicación 13, en donde el conjugado es el conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
15. Uso *in vitro* de un péptido de penetración celular para transportar un principio activo a una célula, opcionalmente a mitocondrias, en donde el péptido de penetración celular comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

20

# ES 2 981 865 T3

FIG. 1

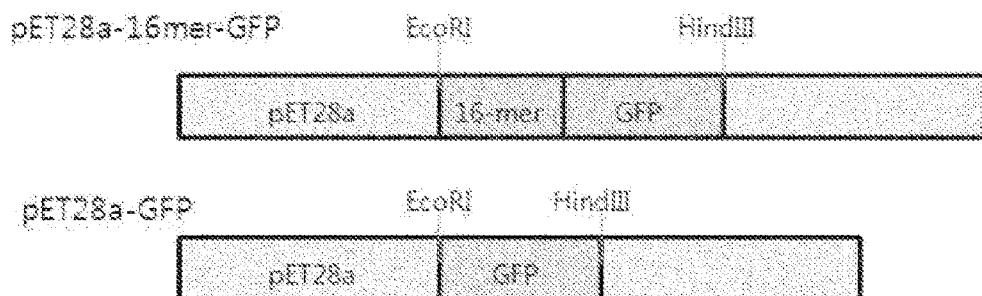


FIG. 2

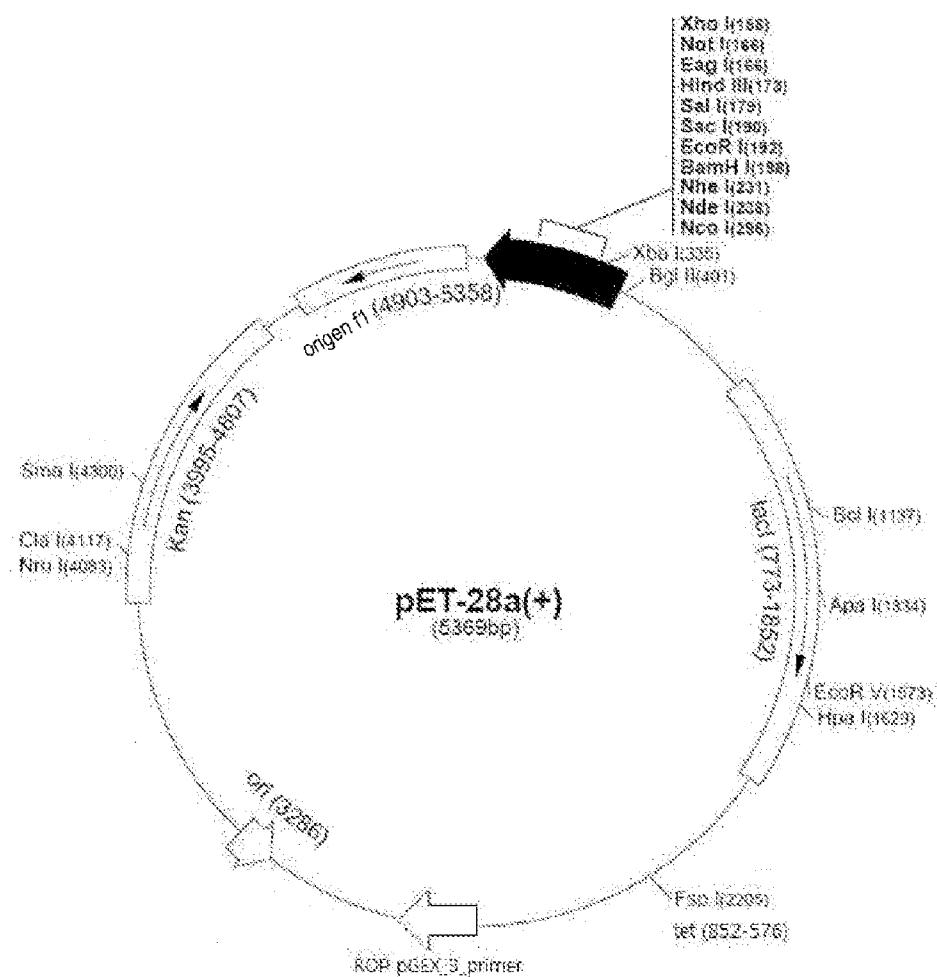


FIG. 3

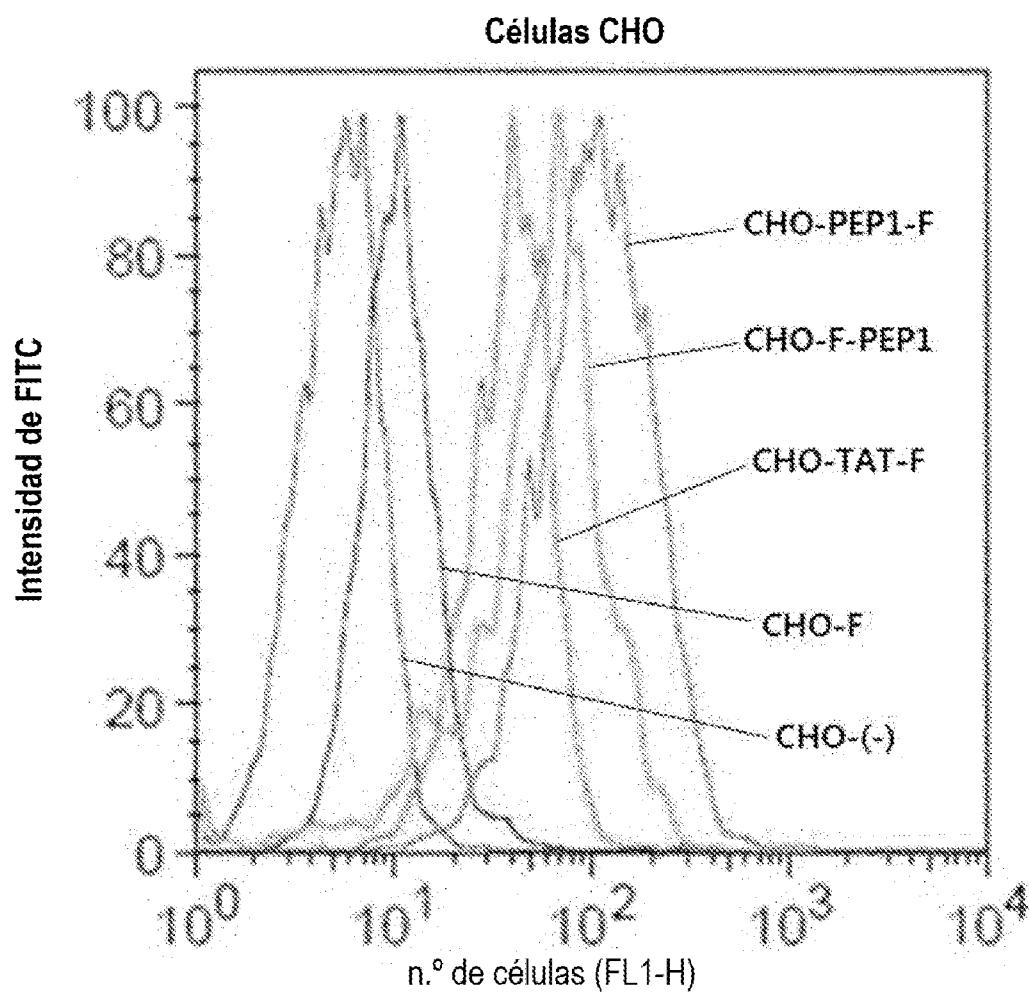
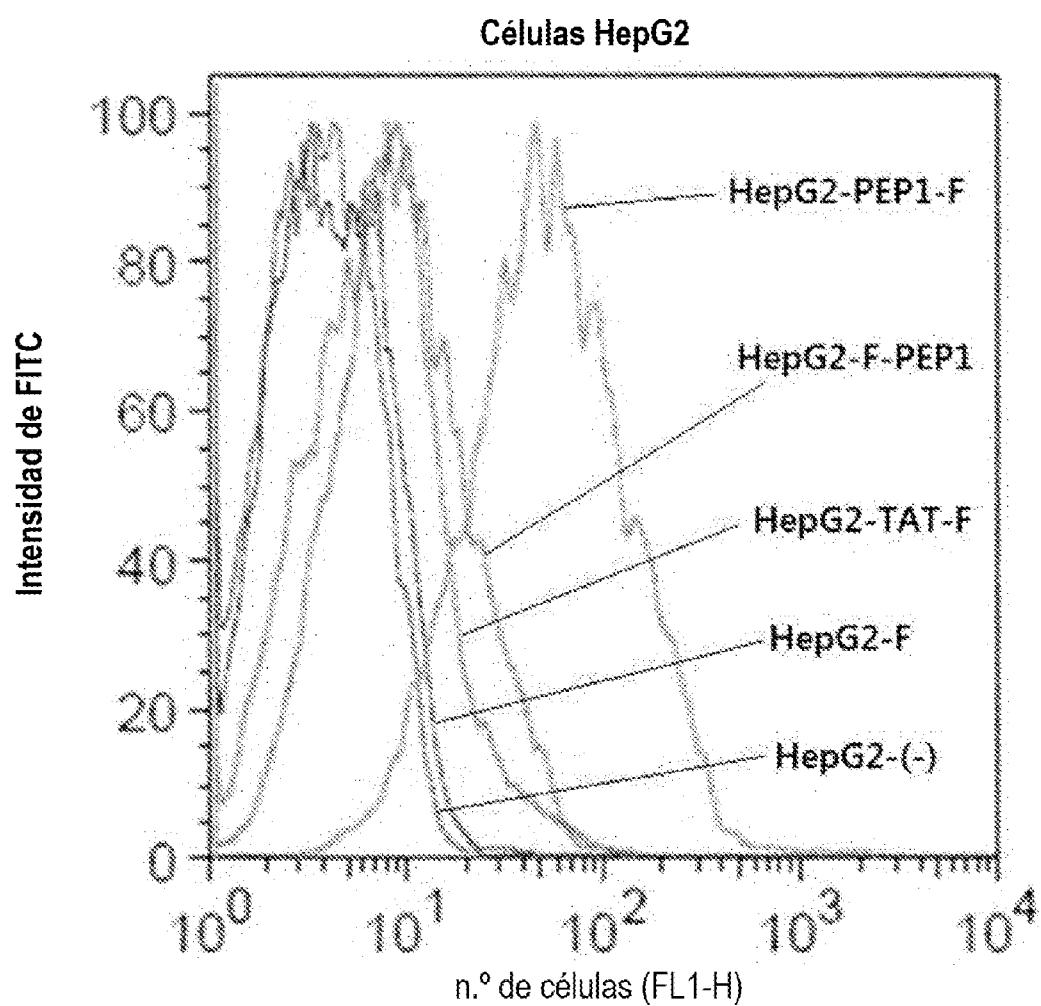


FIG. 4



ES 2 981 865 T3

FIG. 5

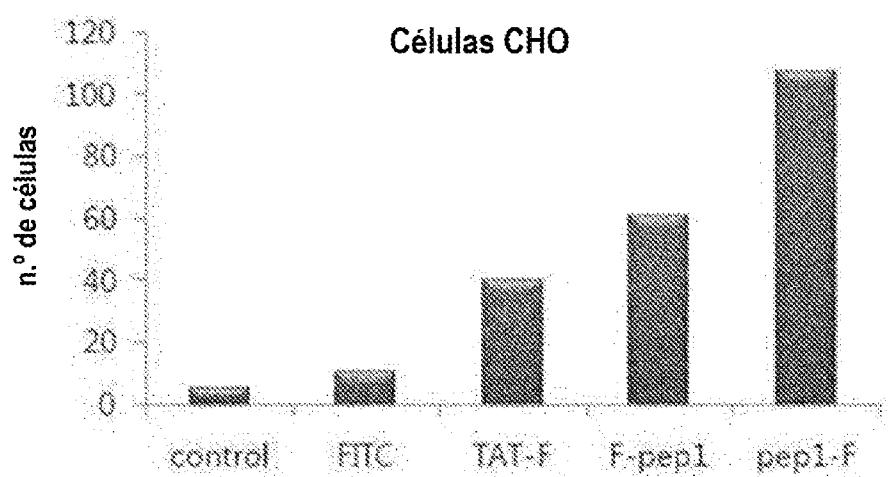


FIG. 6

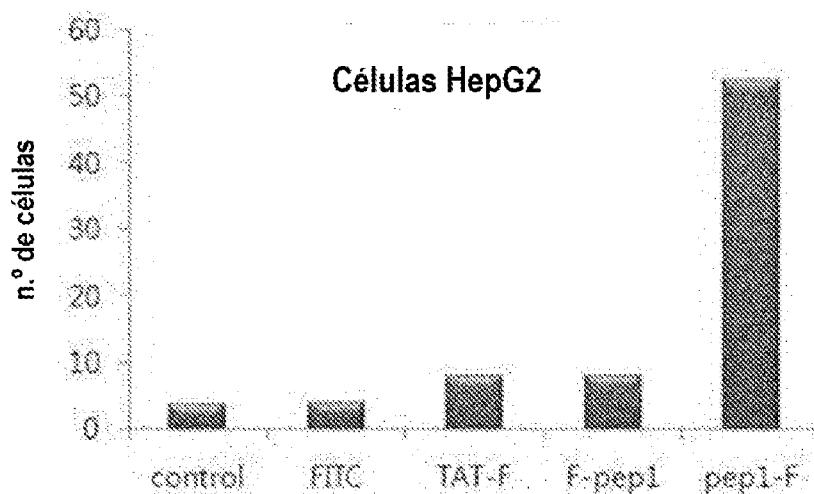


FIG. 7

[Pep1 → FITC]

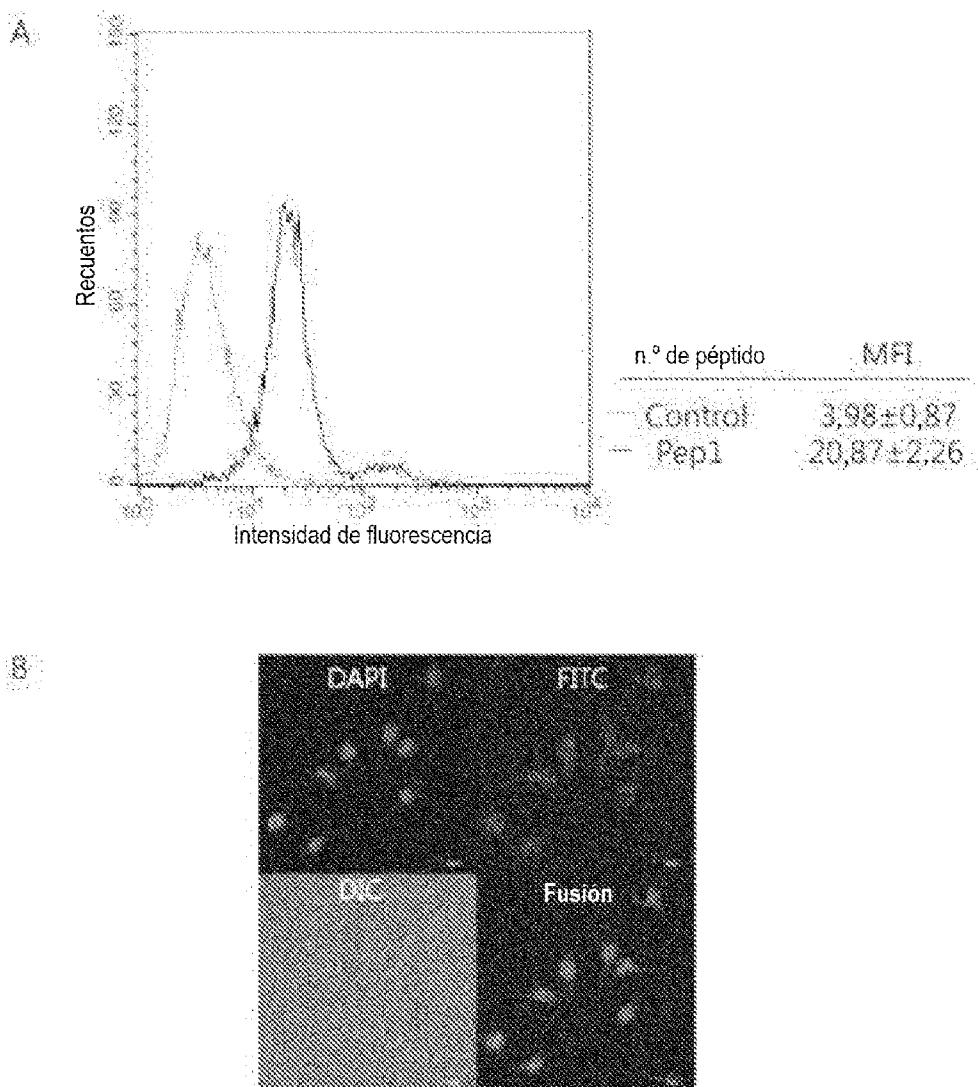


FIG. 8

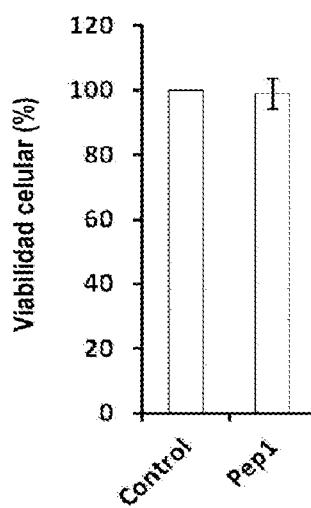


FIG. 9

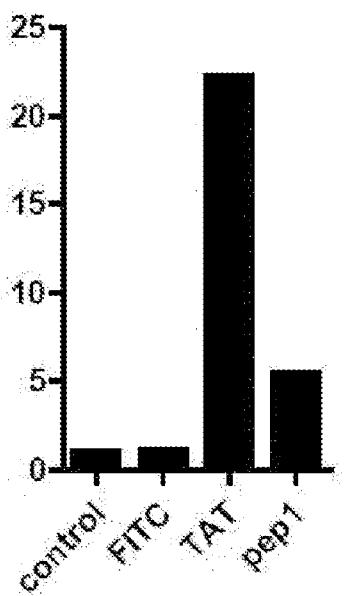


FIG. 10

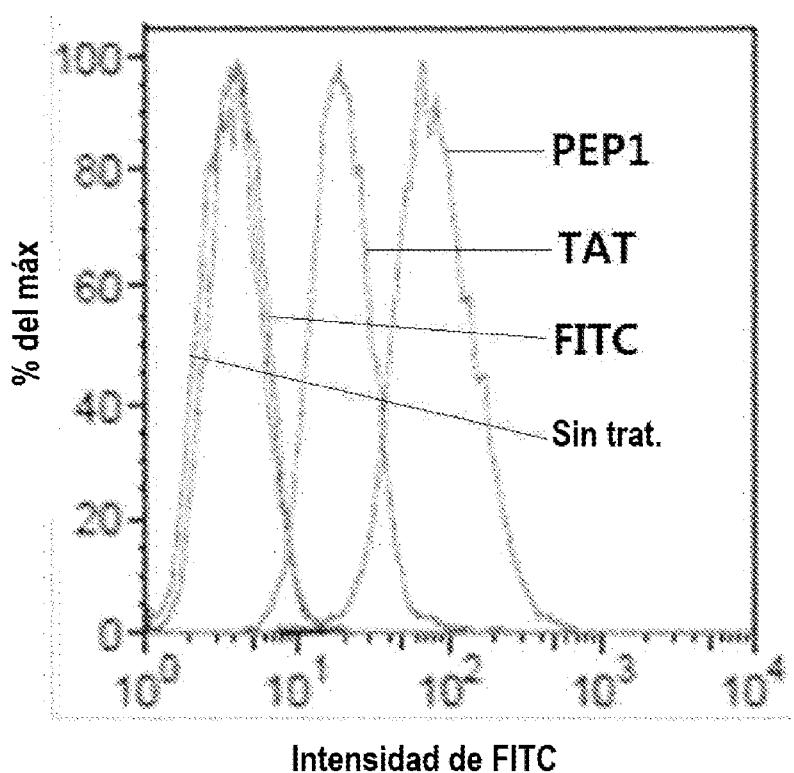


FIG. 11

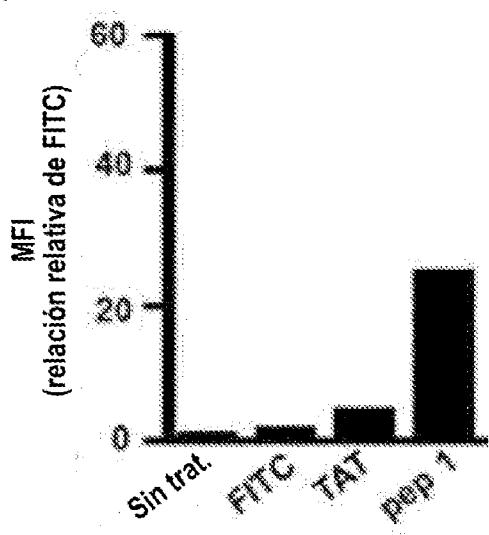


FIG. 12

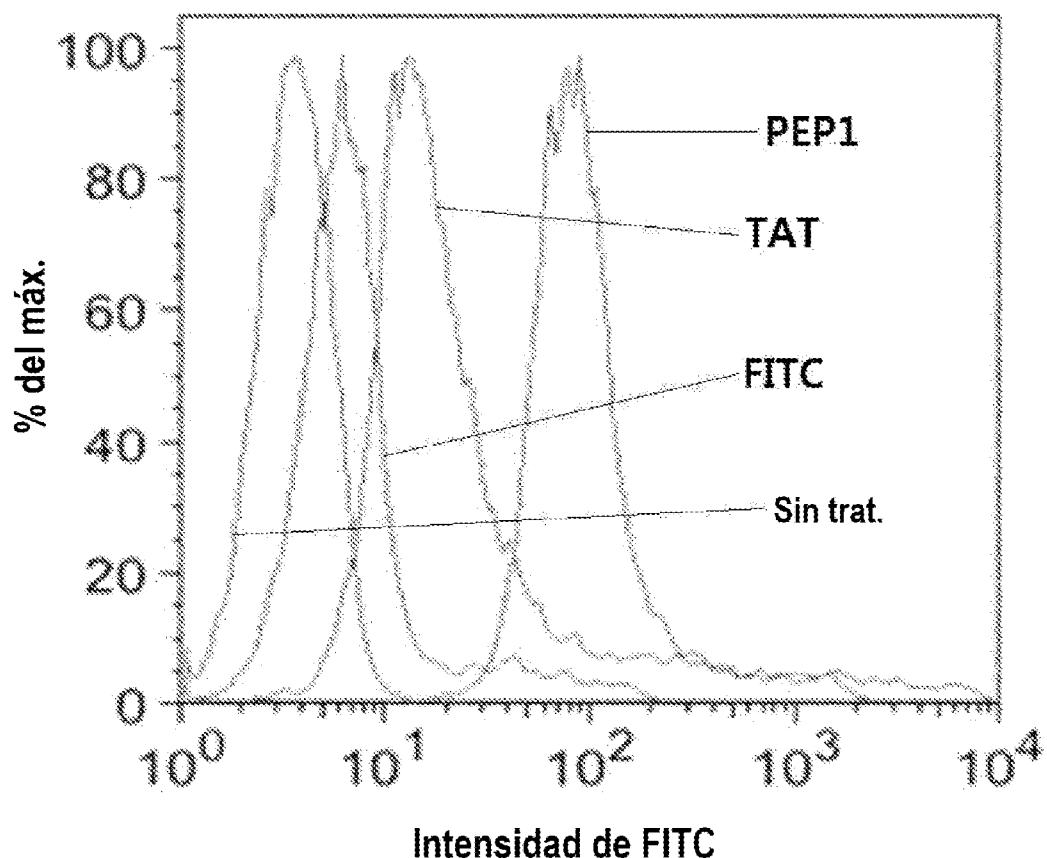


FIG. 13

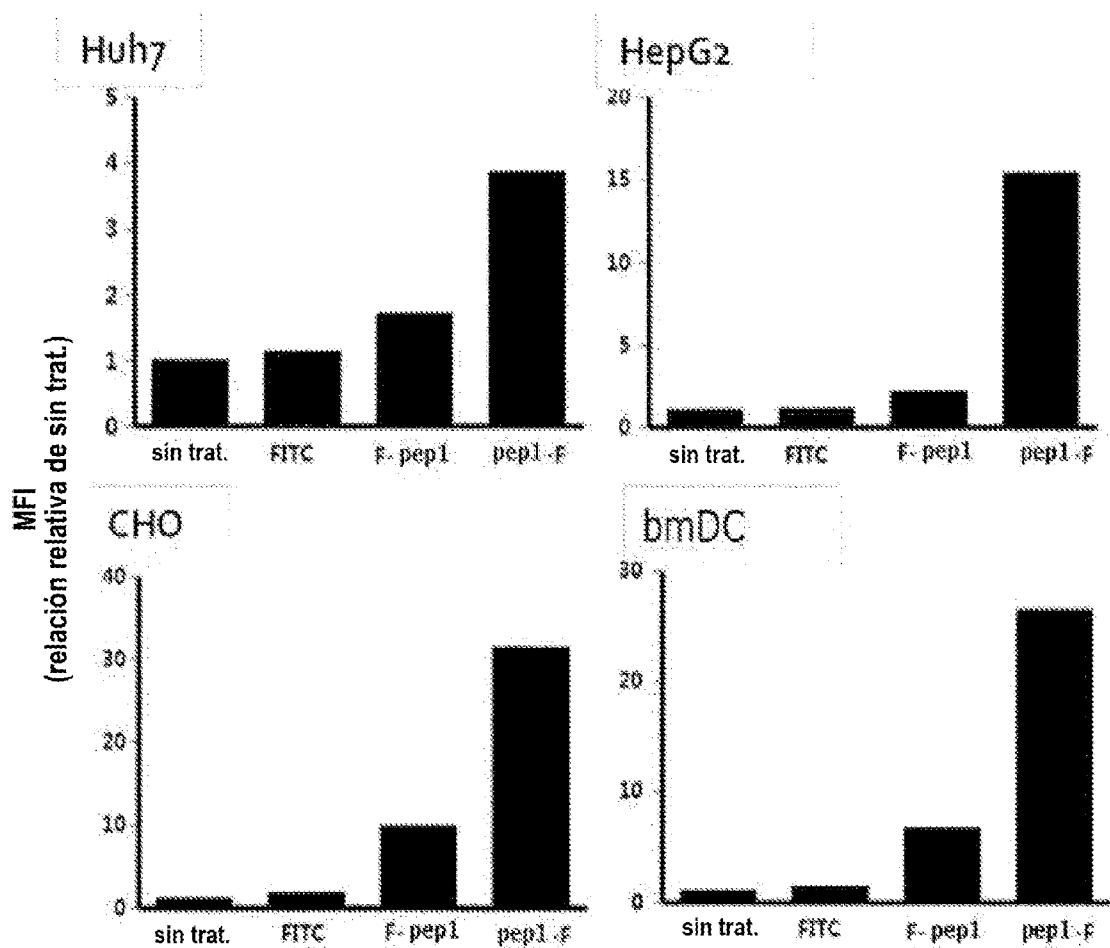
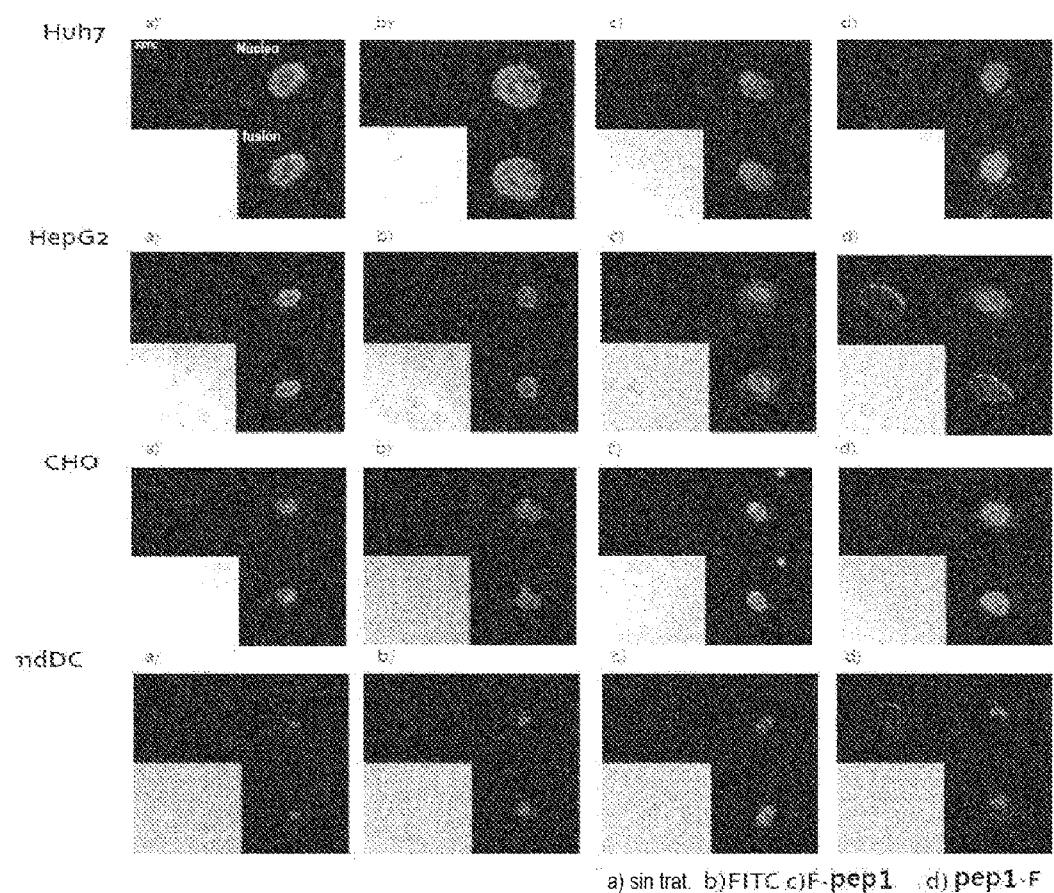
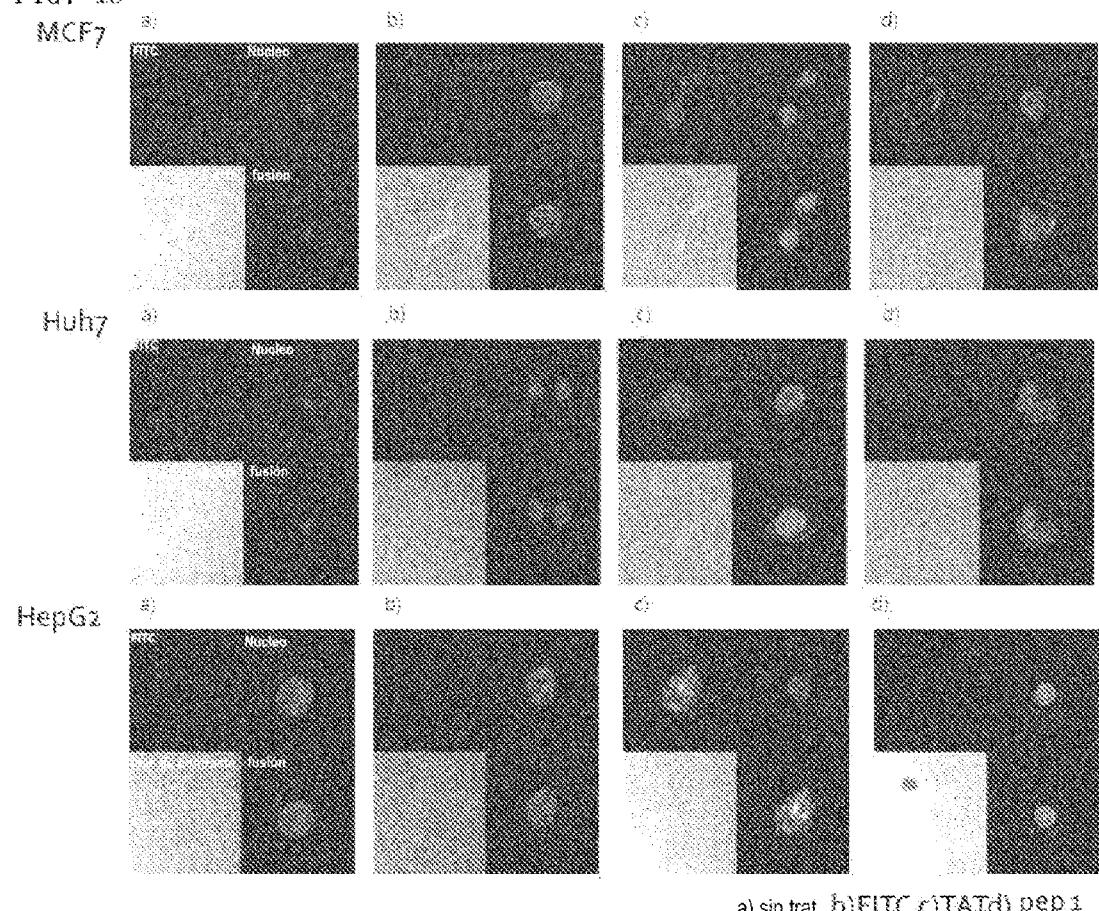


FIG. 14



a) sin trat. b) FITC c)F-pep1. d) pep1-F

FIG. 15



# ES 2 981 865 T3

FIG. 16

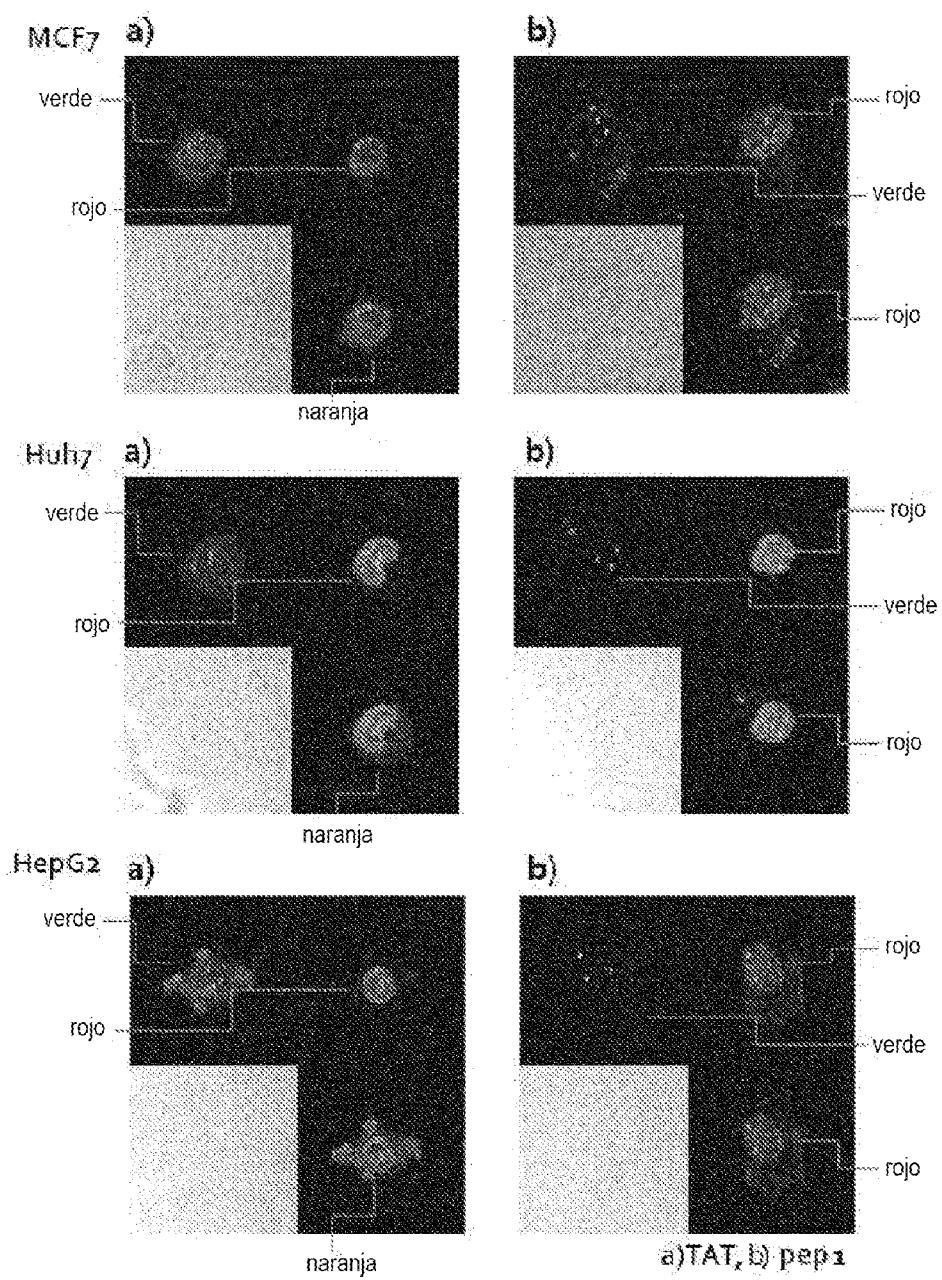
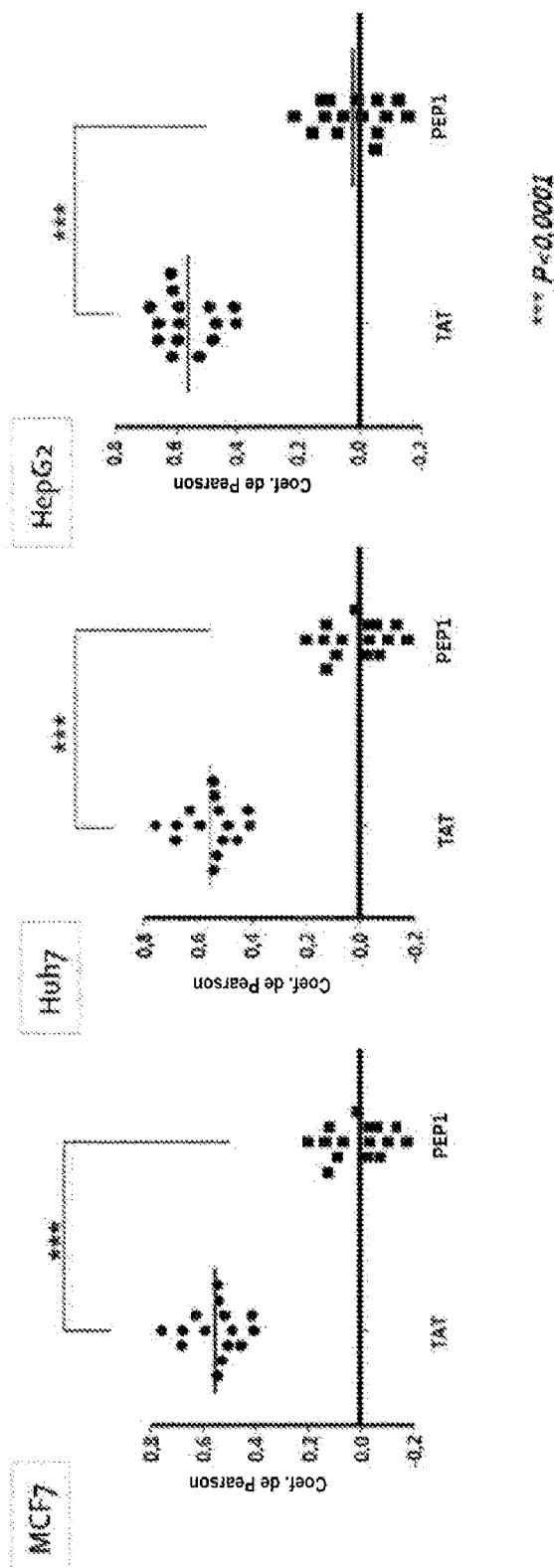


FIG. 17



ES 2 981 865 T3

FIG. 18

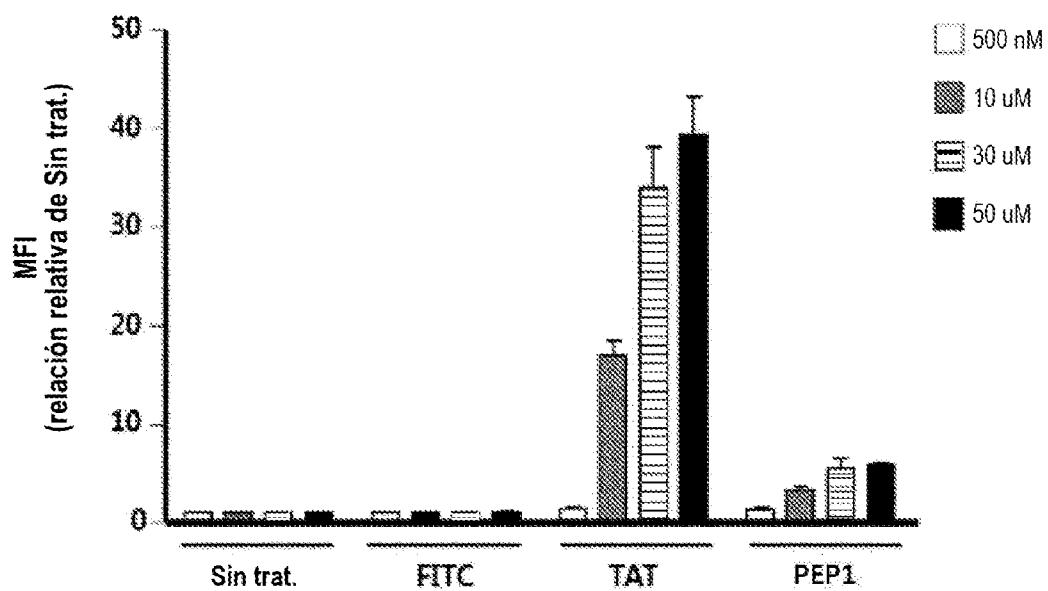
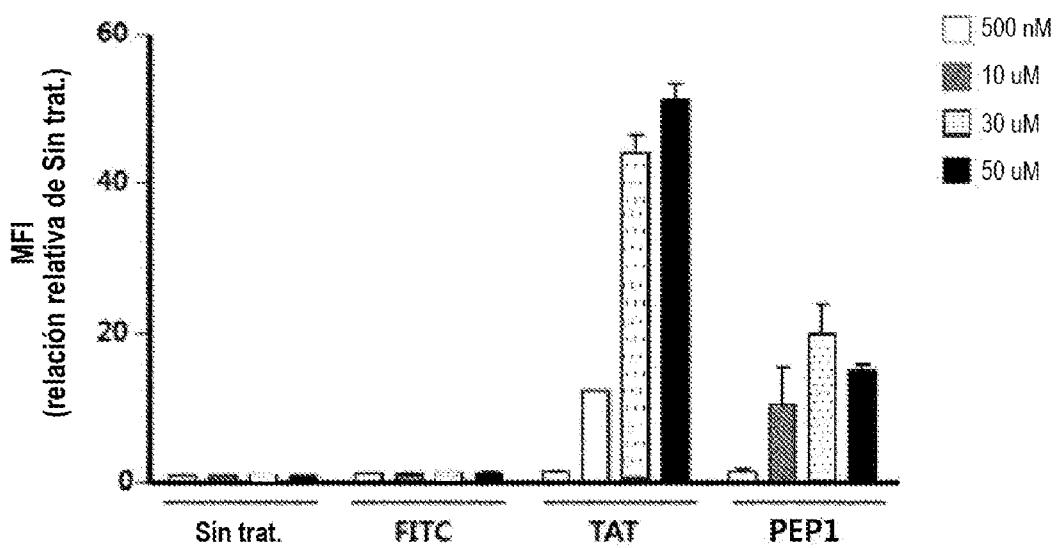


FIG. 19



ES 2 981 865 T3

FIG. 20

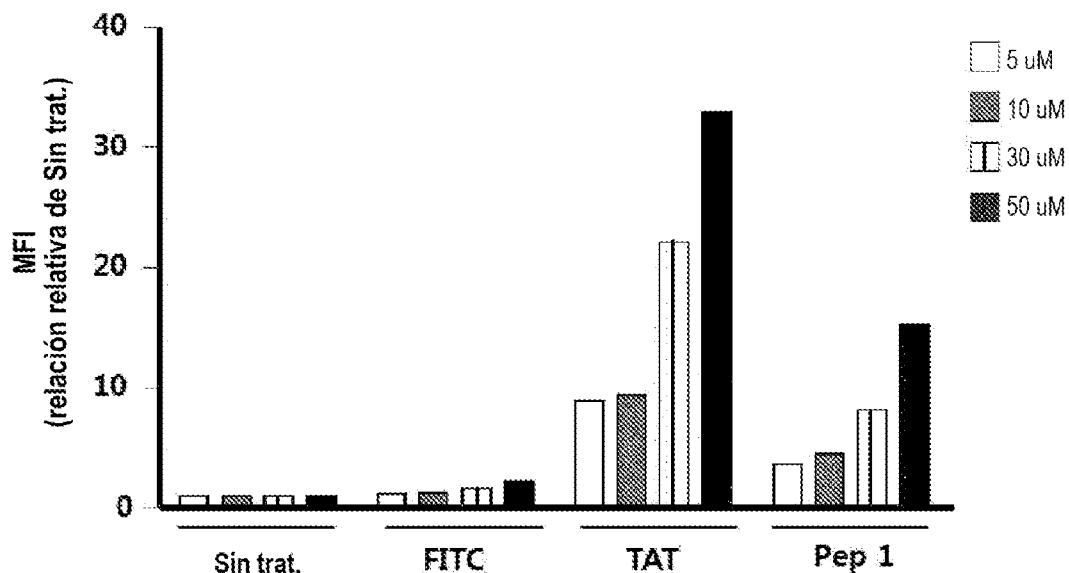
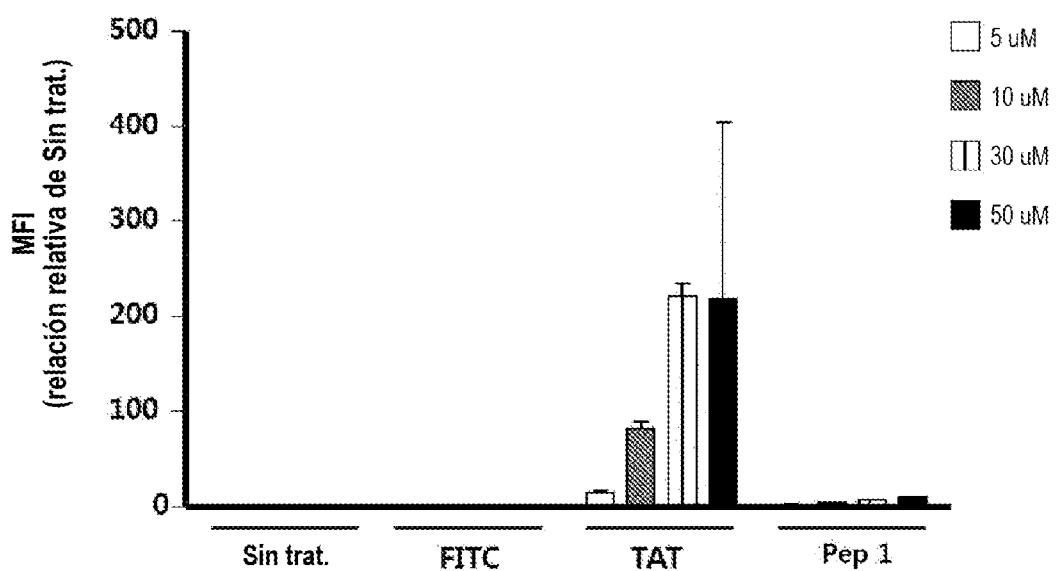


FIG. 21



ES 2 981 865 T3

FIG. 22

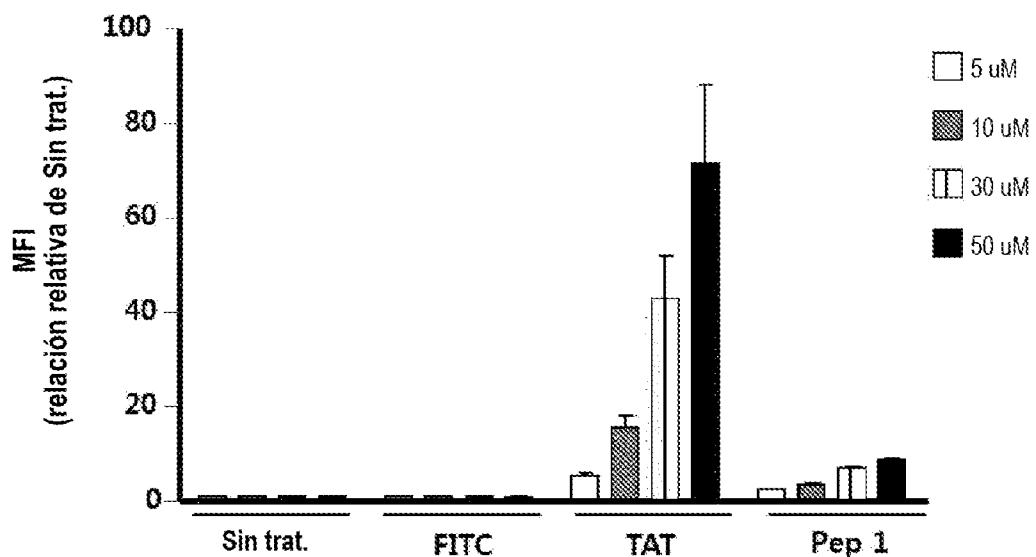


FIG. 23

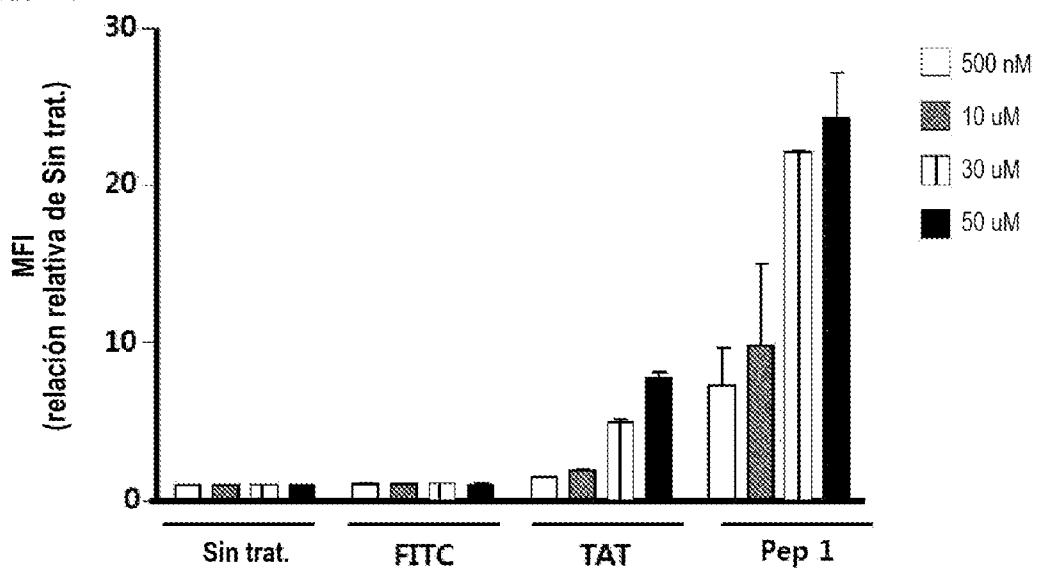


FIG. 24

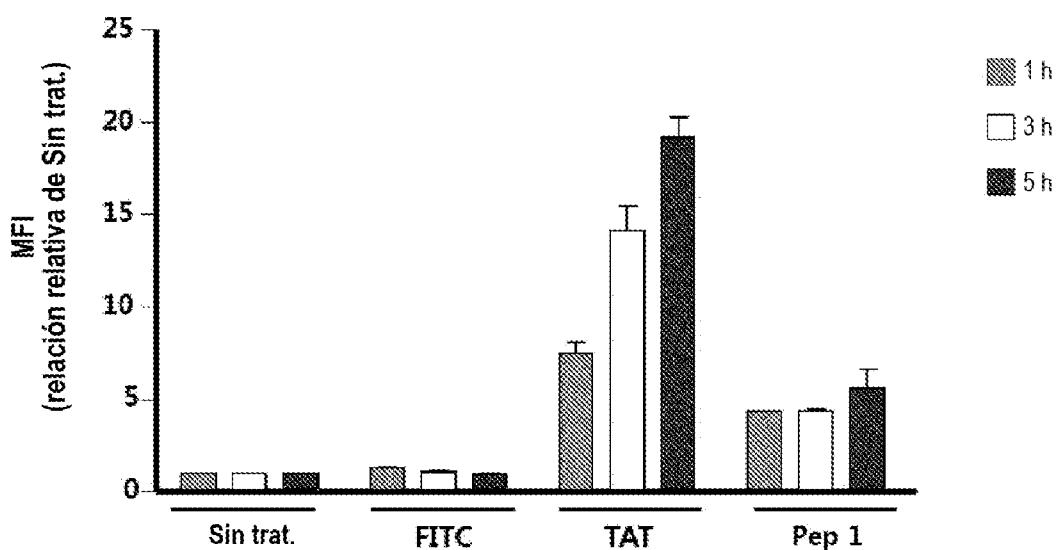


FIG. 25

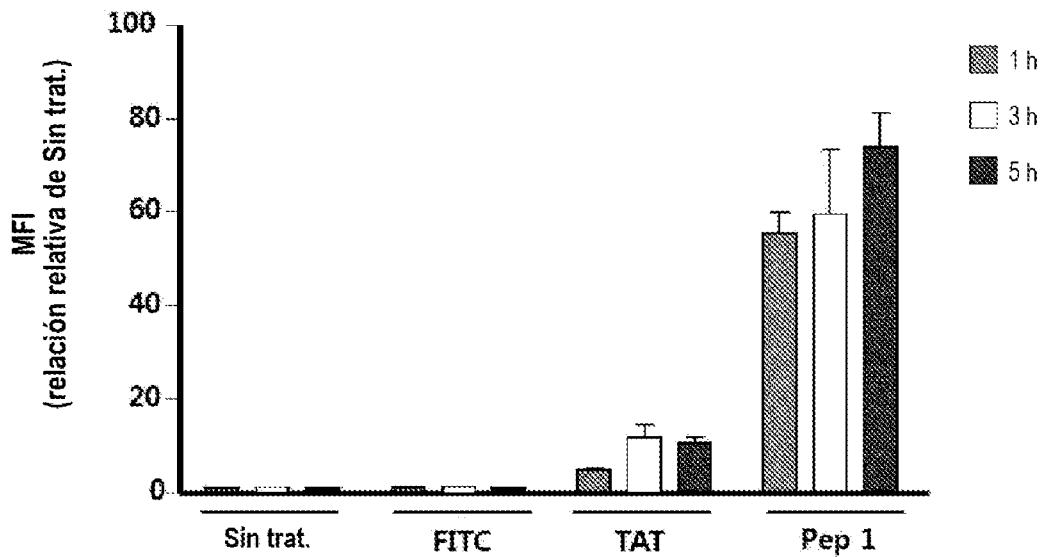


FIG. 26

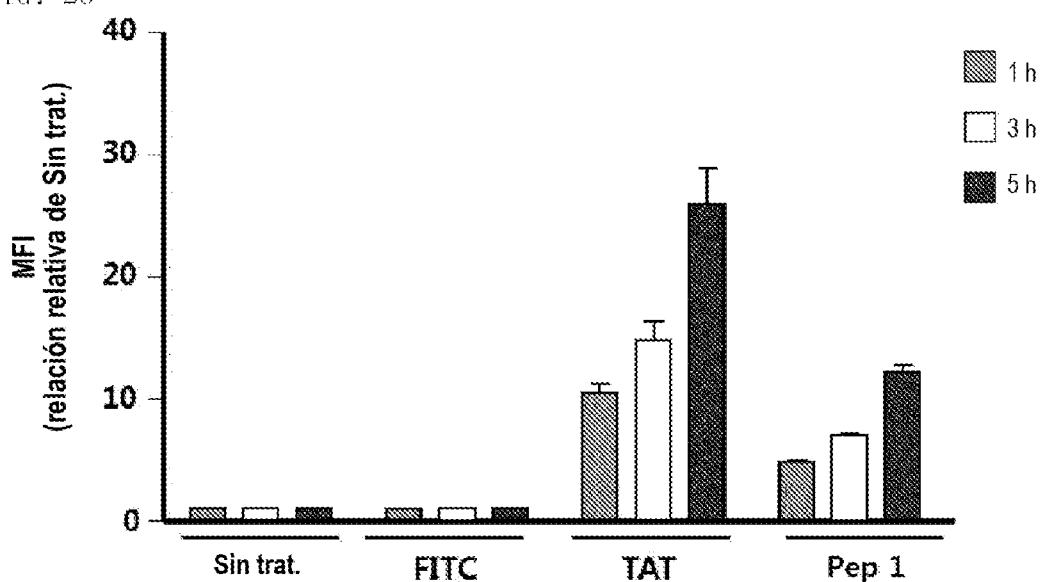


FIG. 27

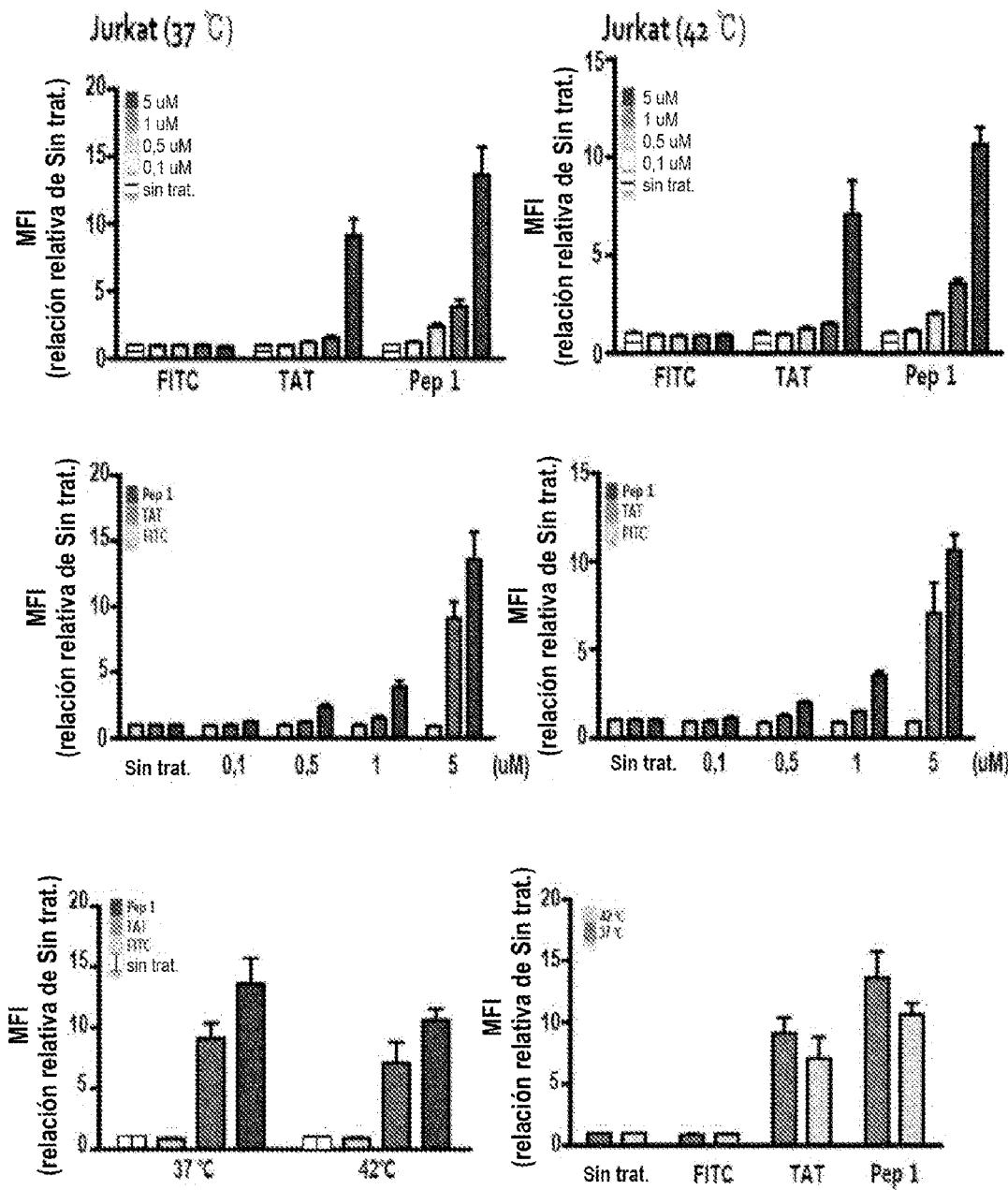


FIG. 28

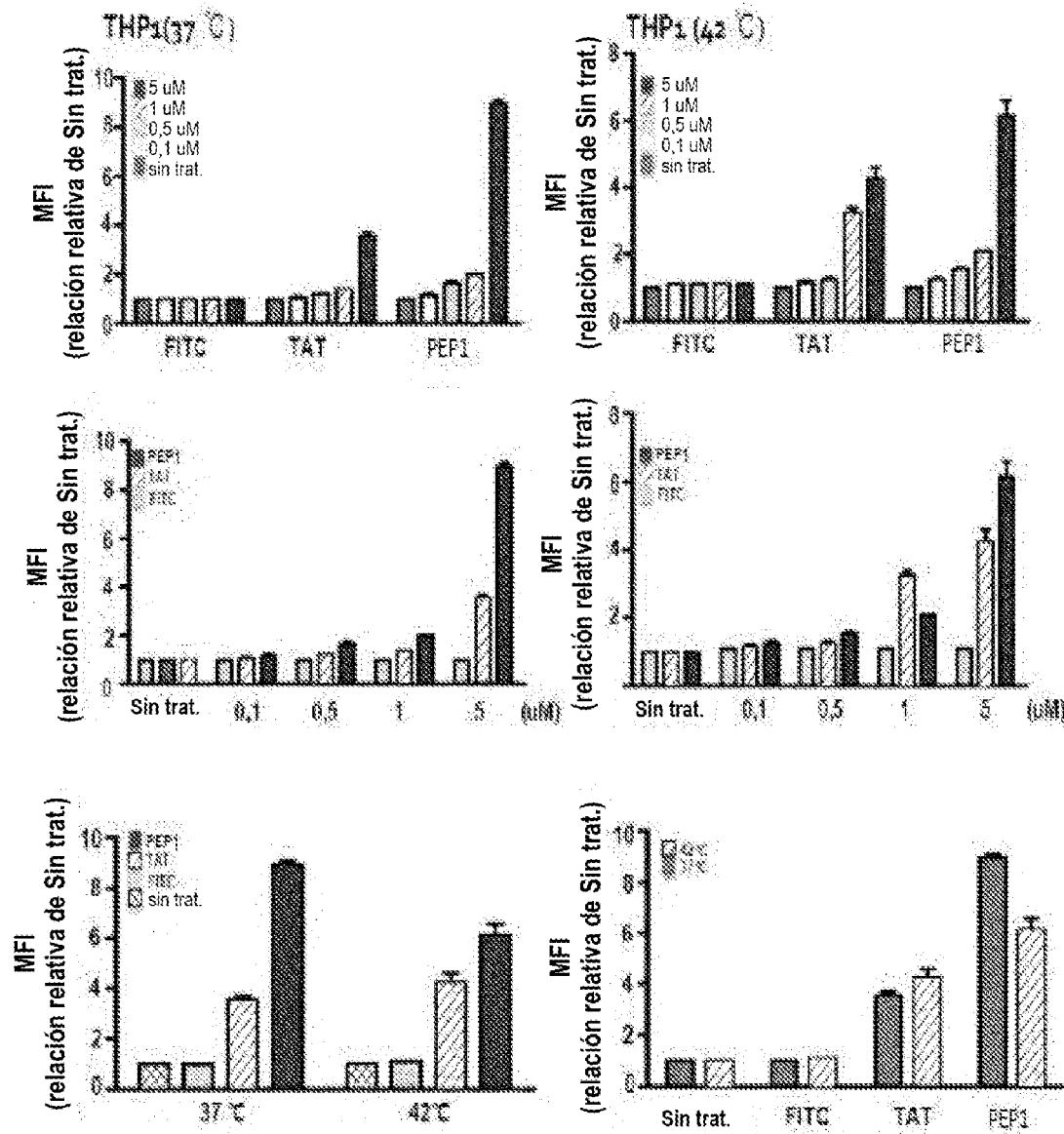


FIG. 29

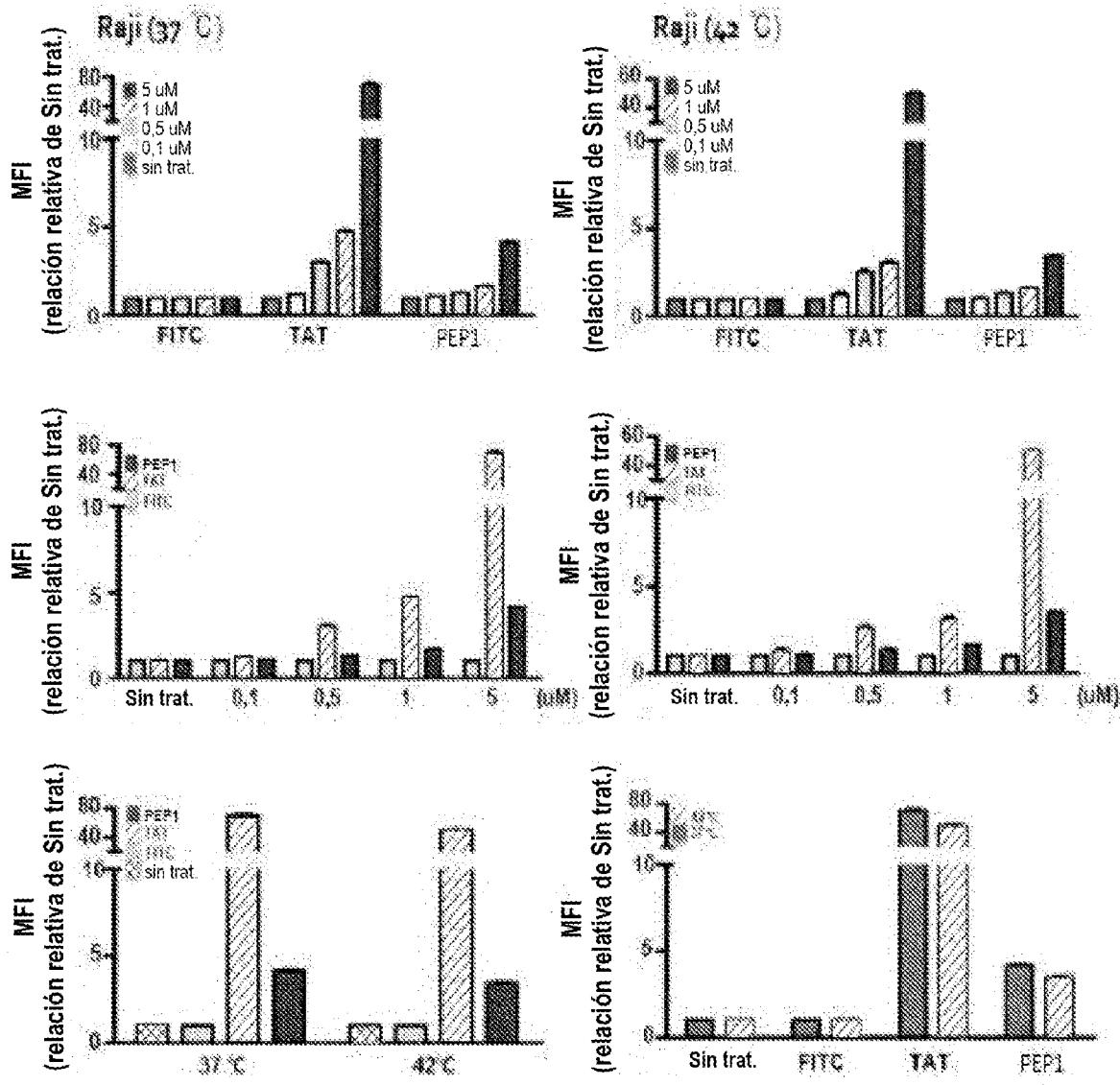


FIG. 30

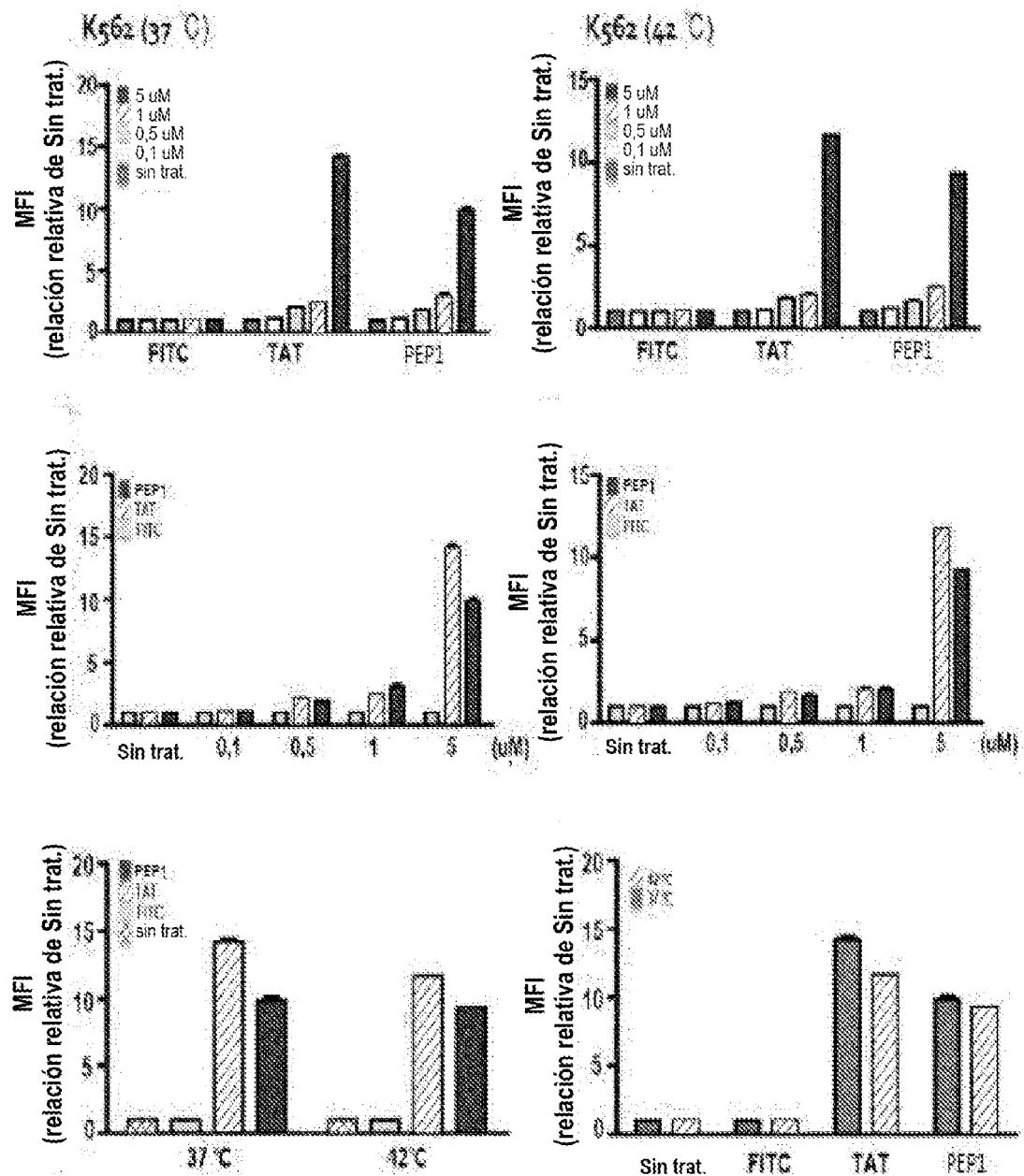


FIG. 31.

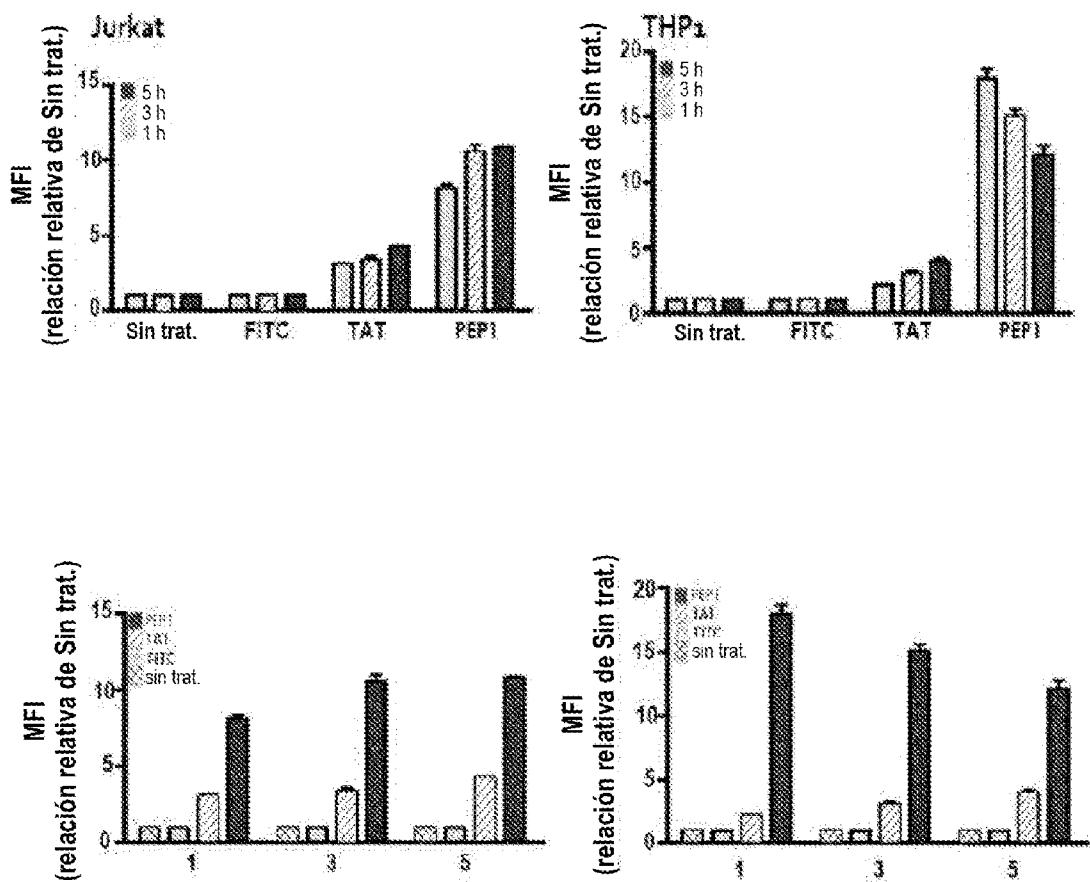


FIG. 32

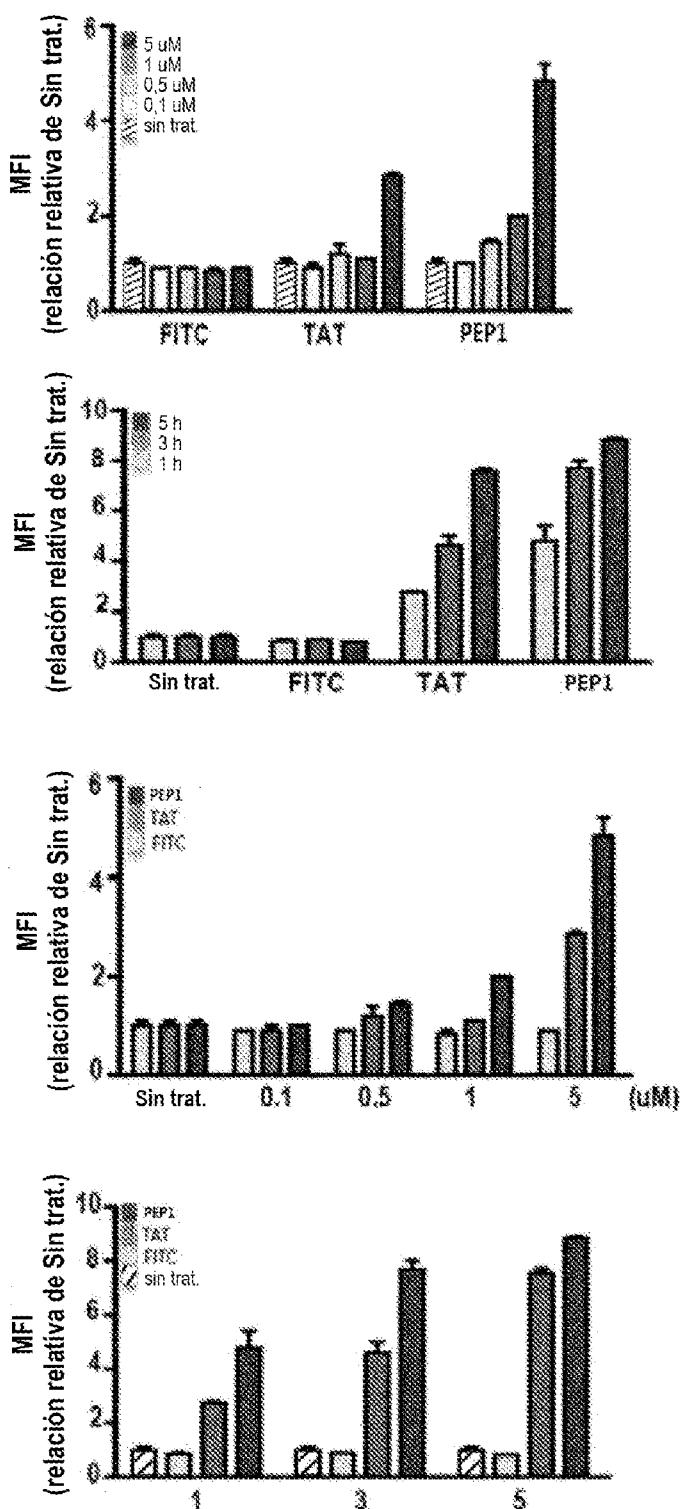
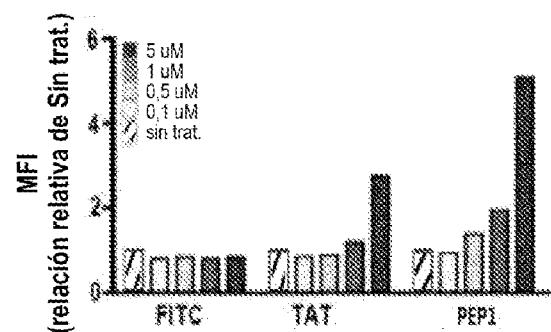


FIG. 33

Linfocito



monocito

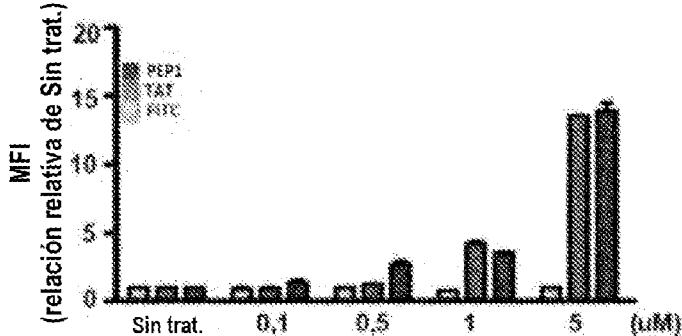
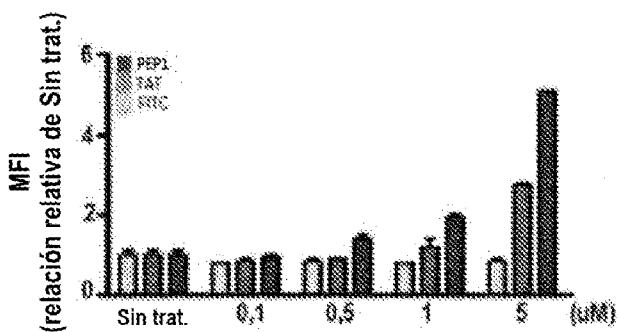
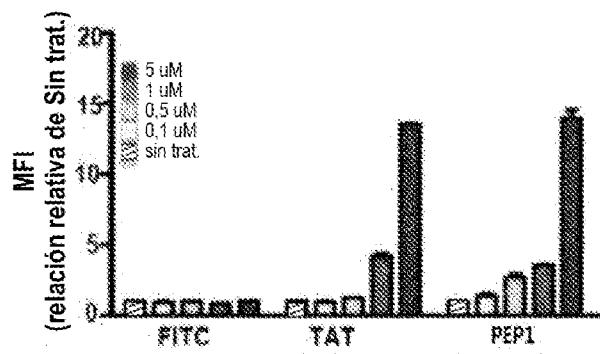


FIG. 34

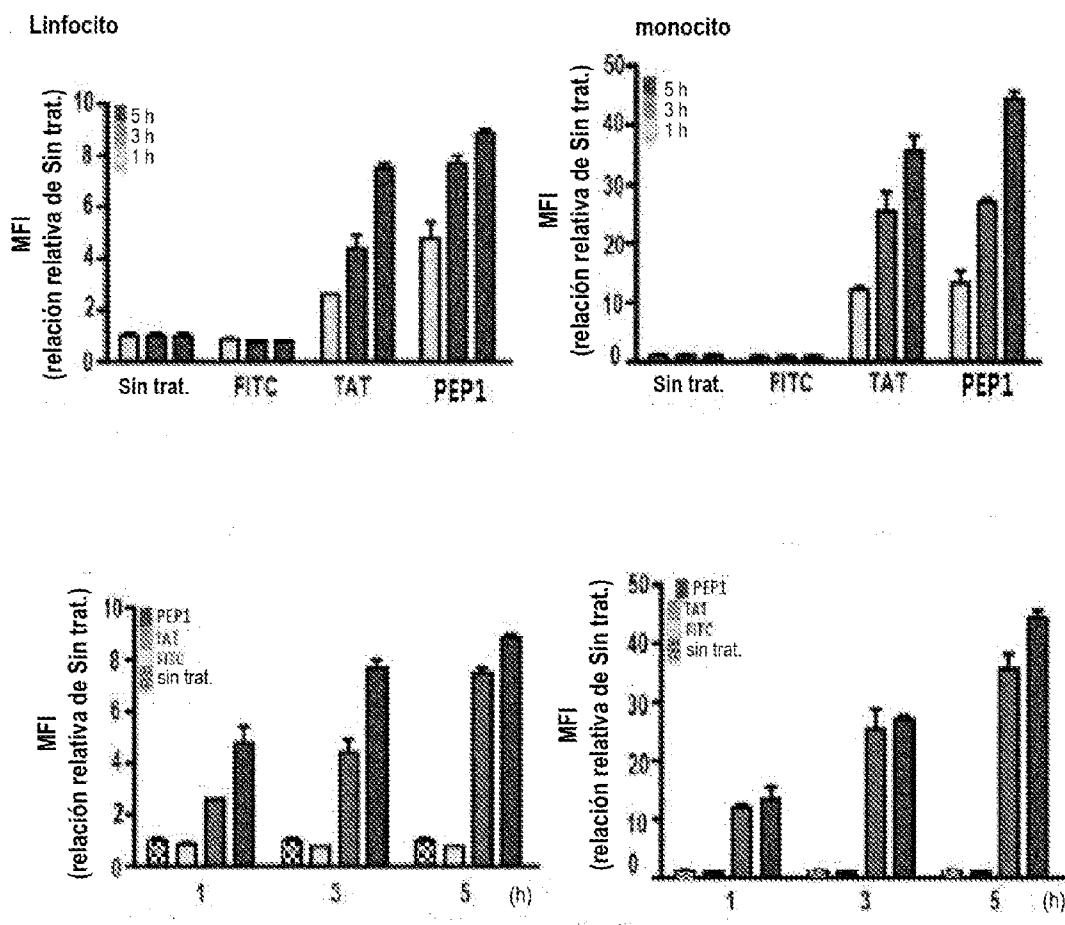


FIG. 35

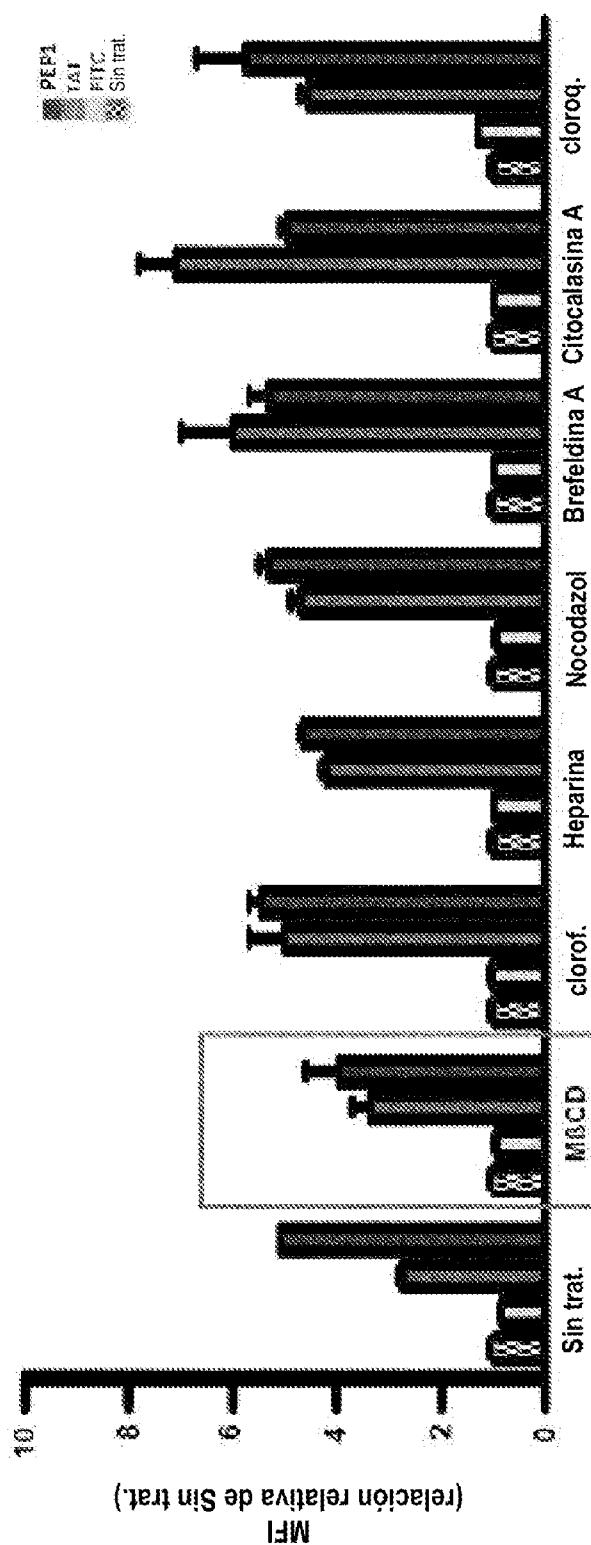


FIG. 36

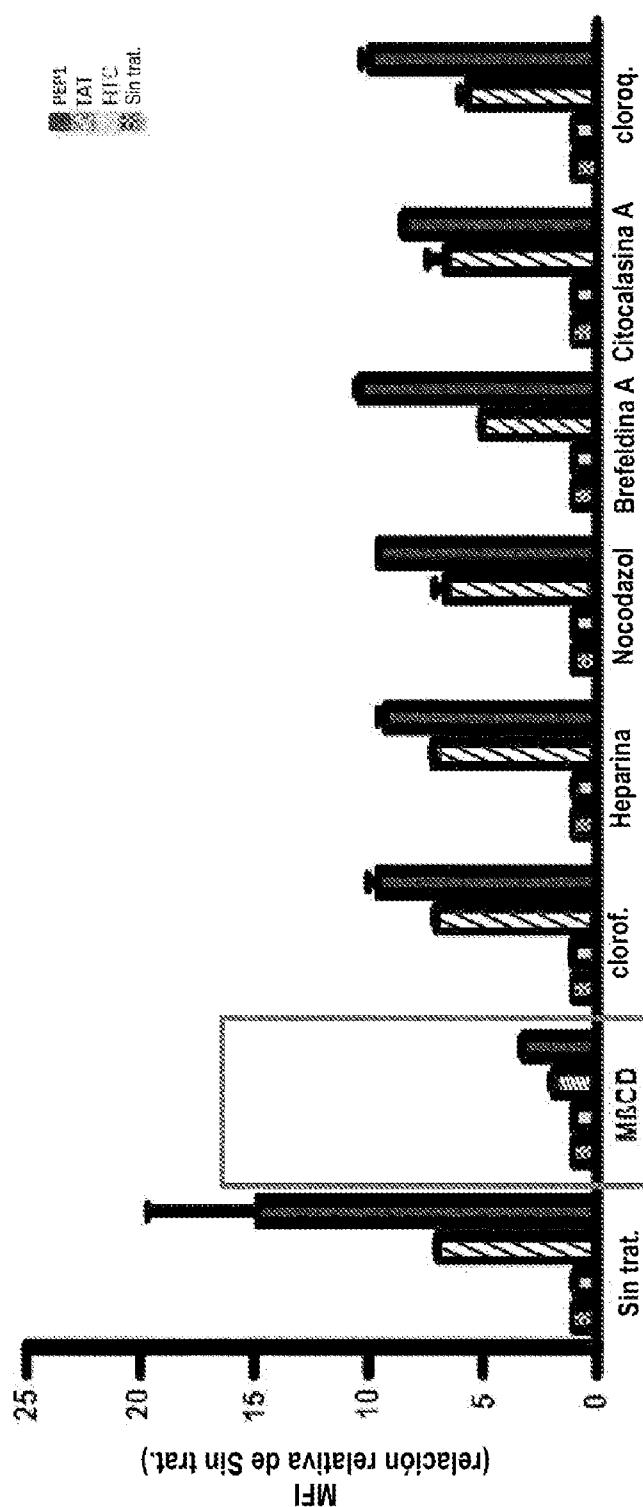
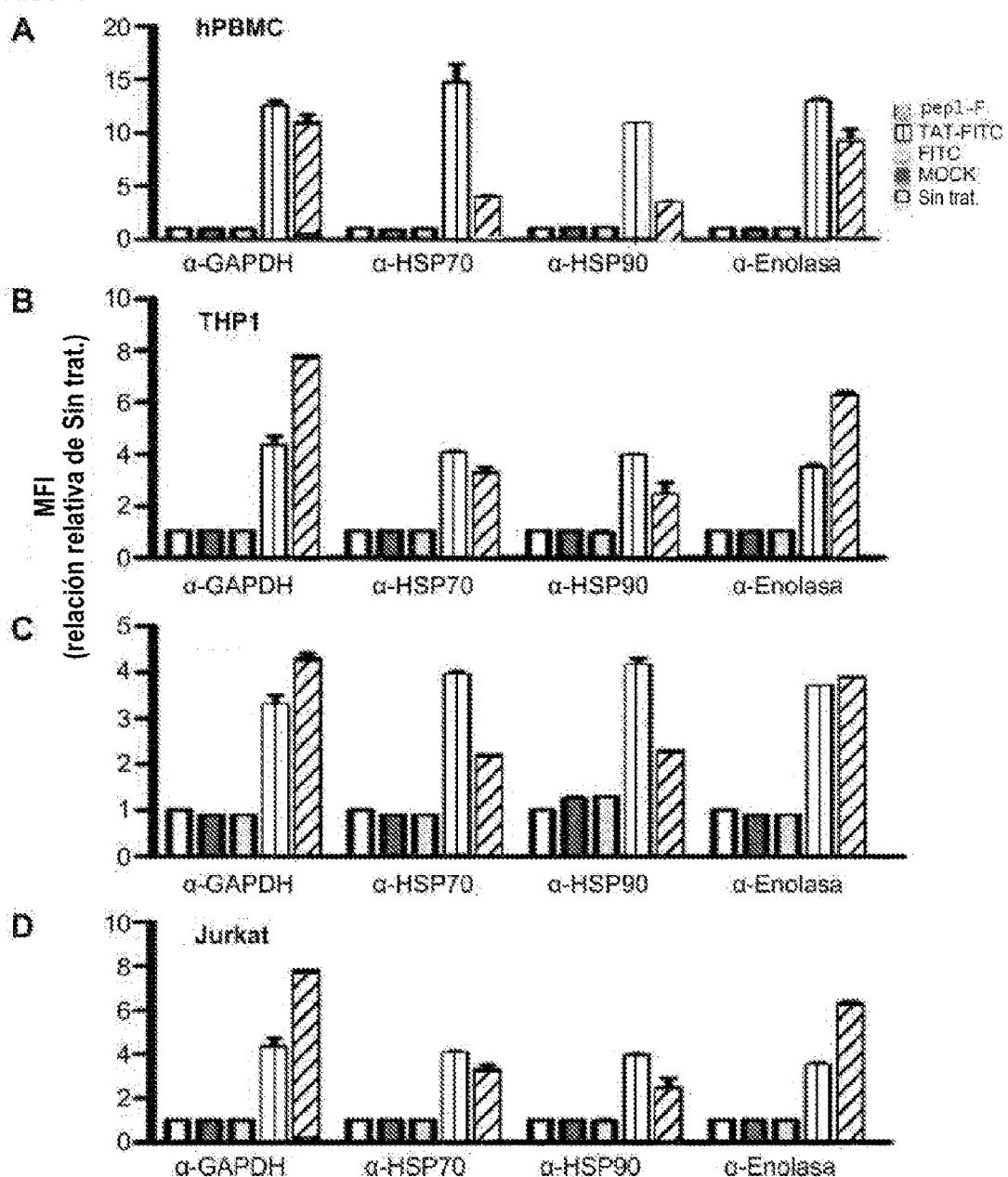
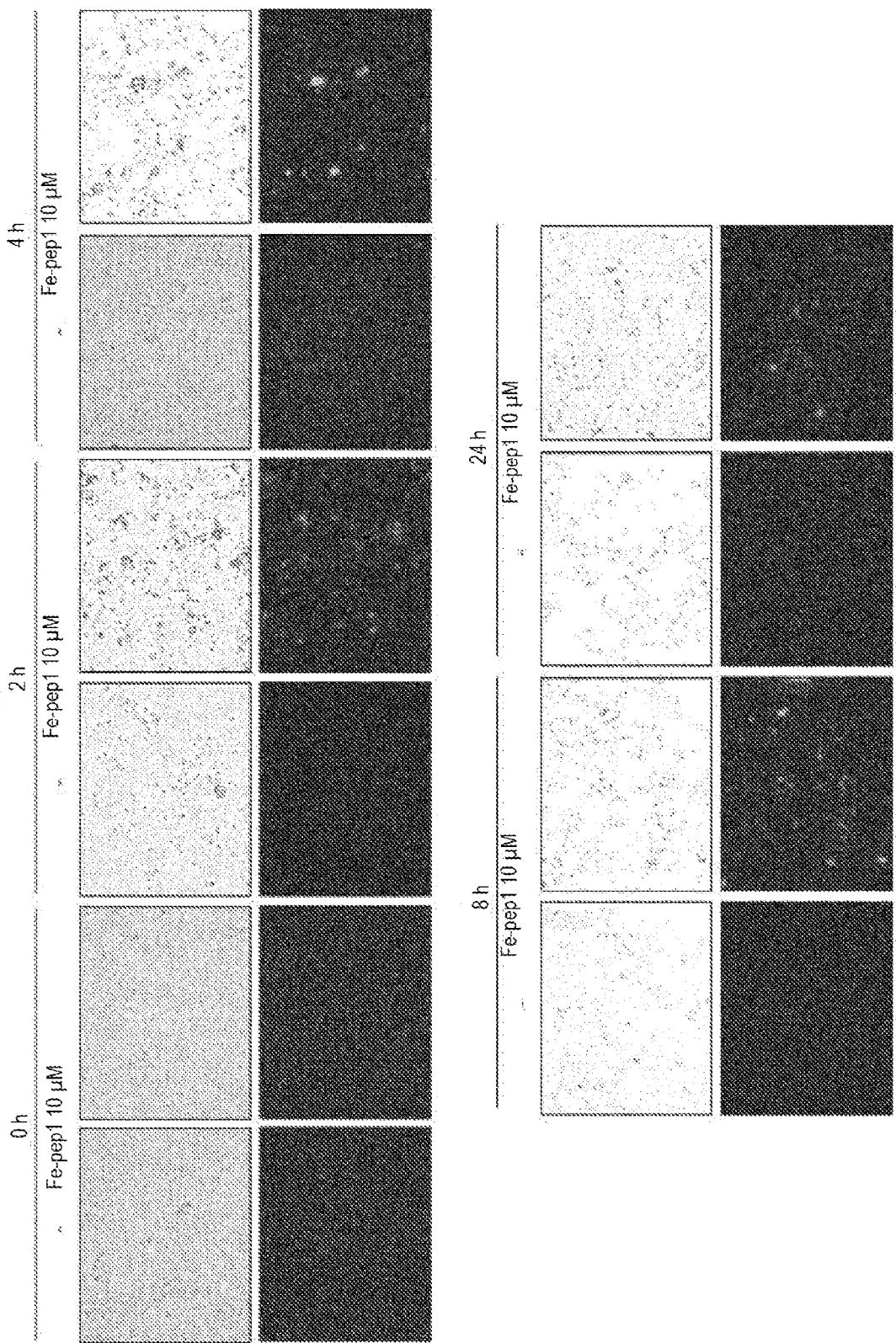


FIG. 37



ES 2 981 865 T3

FIG. 38



ES 2 981 865 T3

FIG. 39

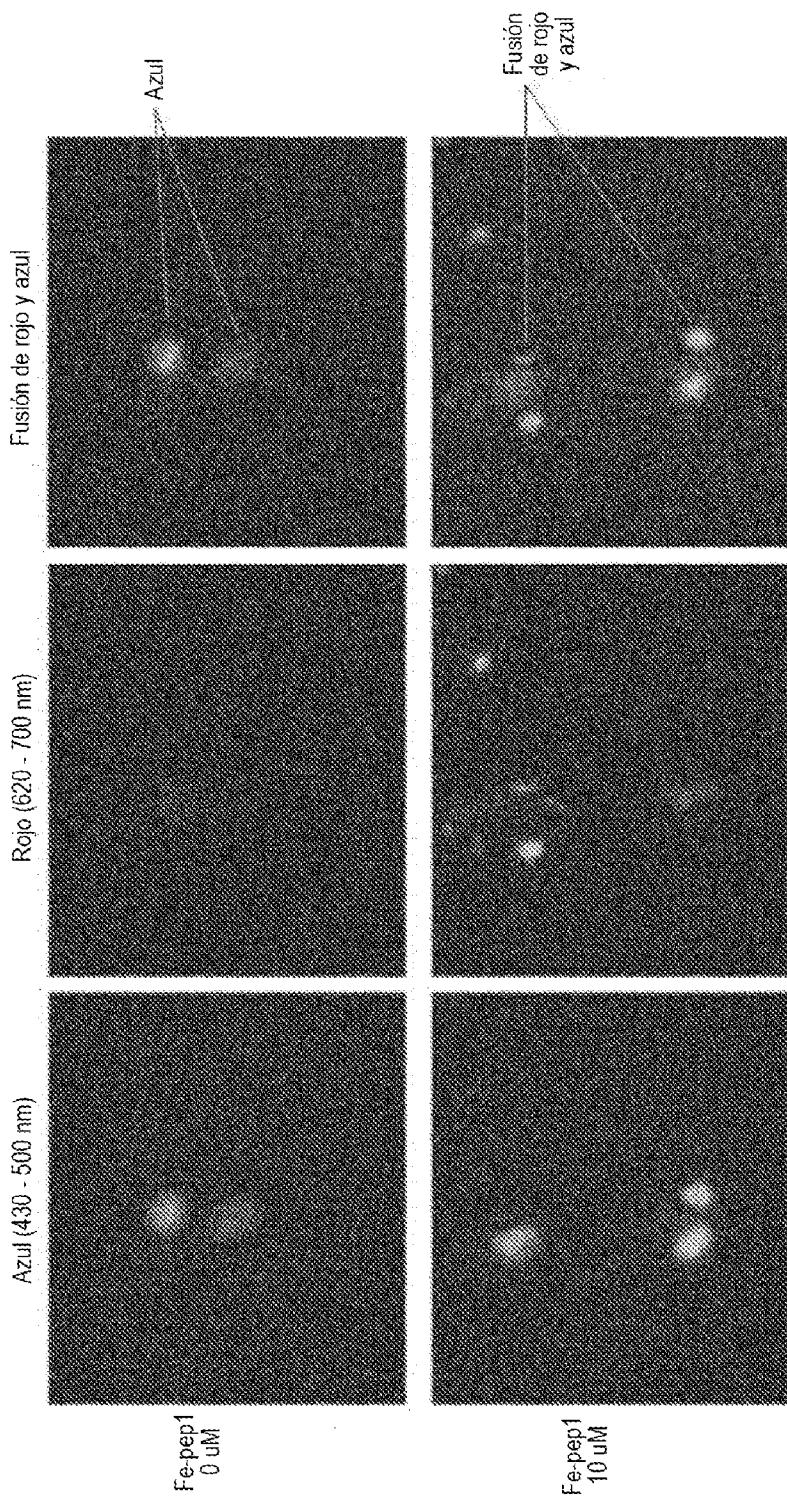
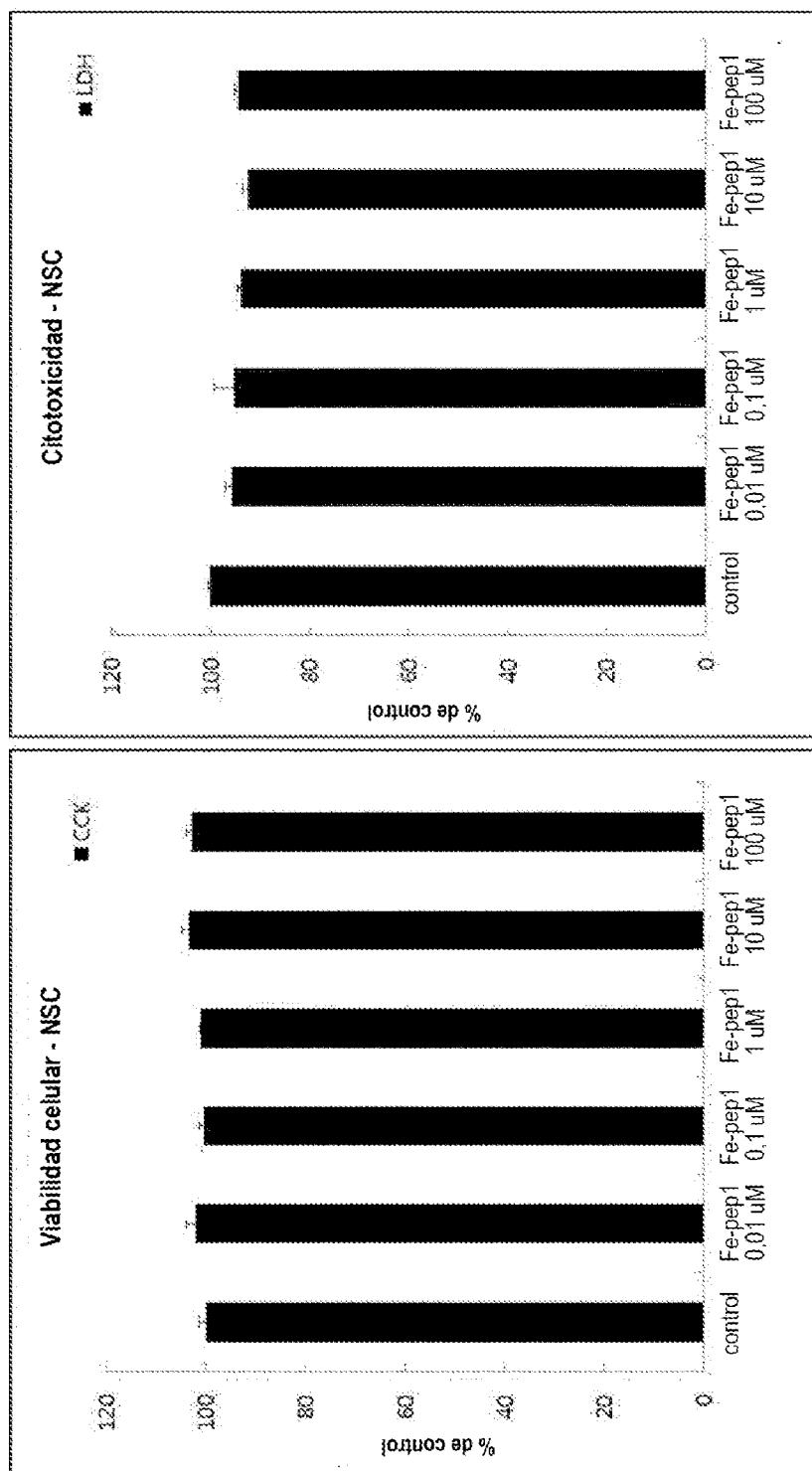


FIG. 40



ES 2 981 865 T3

FIG. 41

Células madre con pep1-Fe

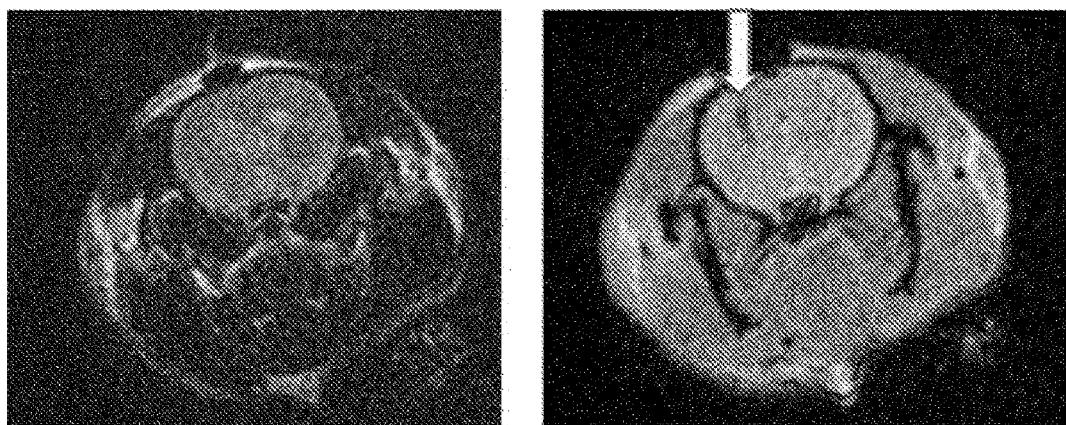
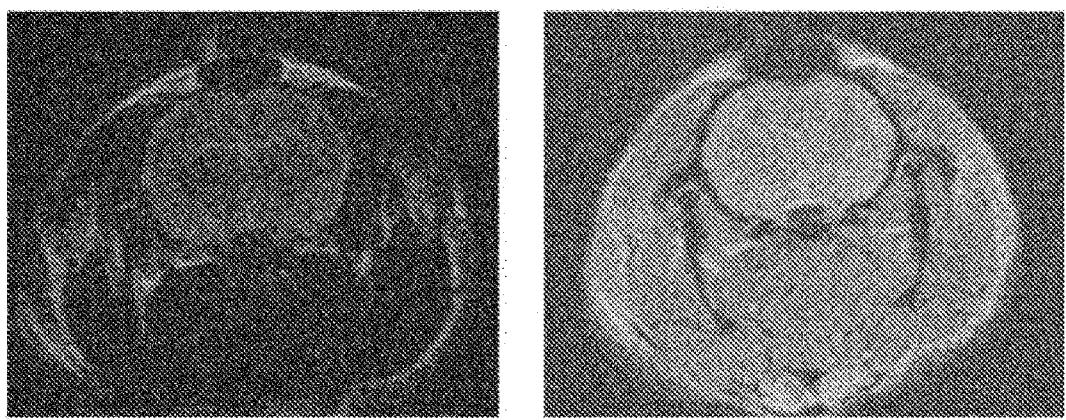


FIG. 42

Células madre sin pep1-Fe



ES 2 981 865 T3

FIG. 43

pepl-Fe

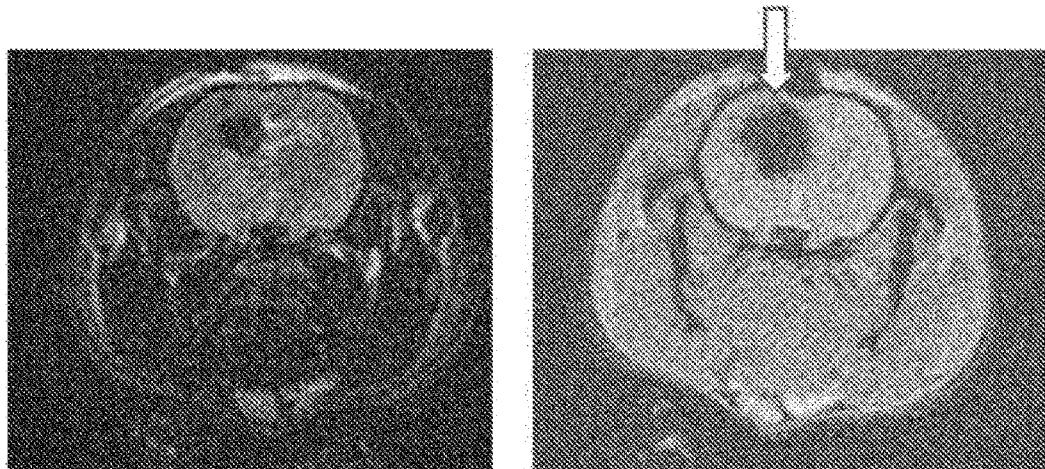


FIG. 44

Solución salina

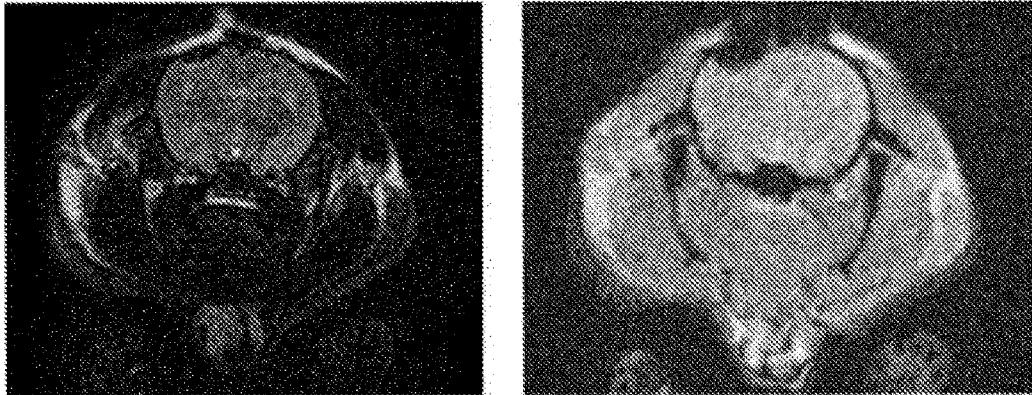


FIG. 45

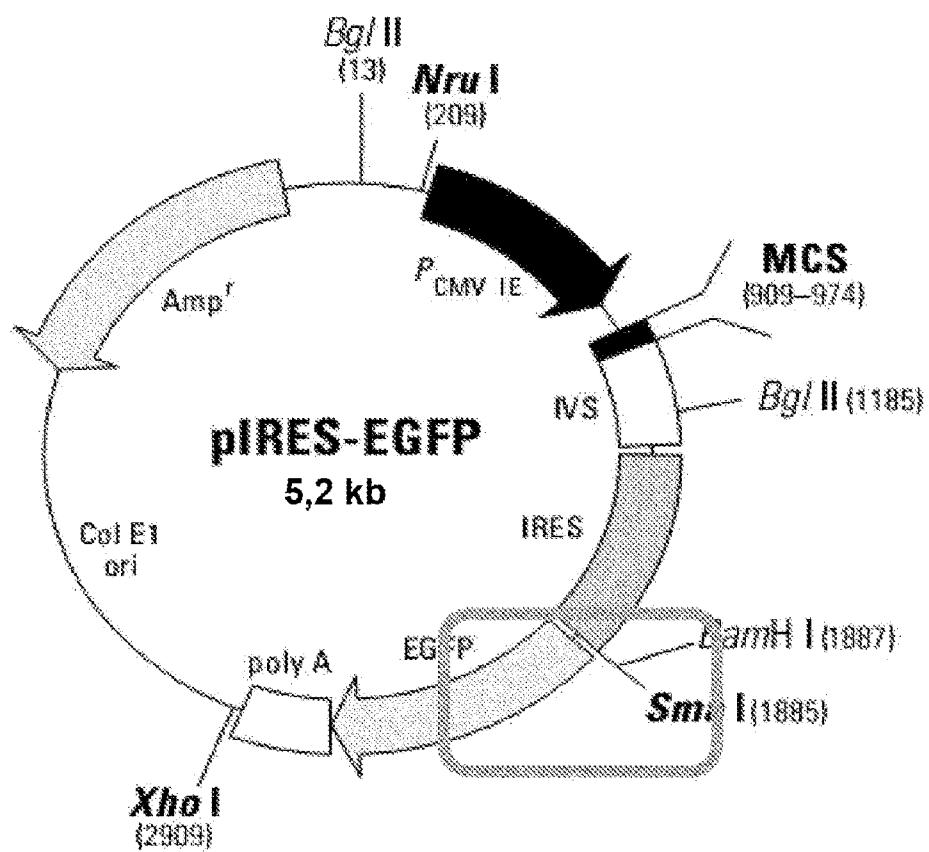


FIG. 46

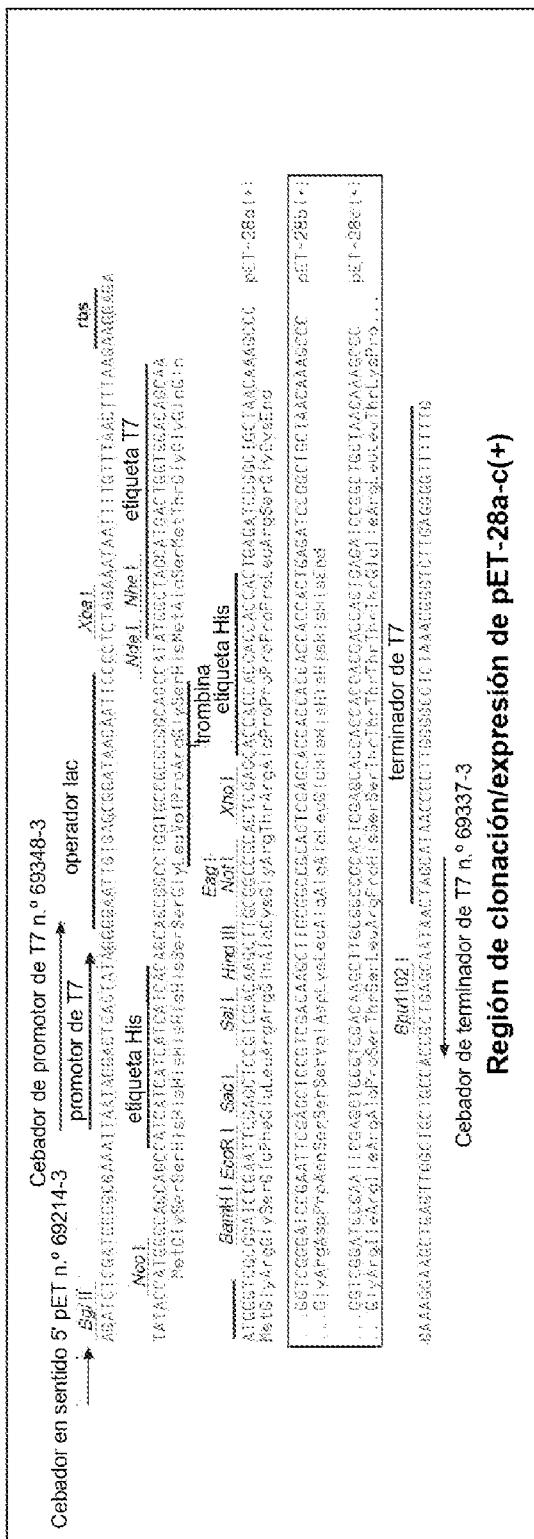


FIG. 47

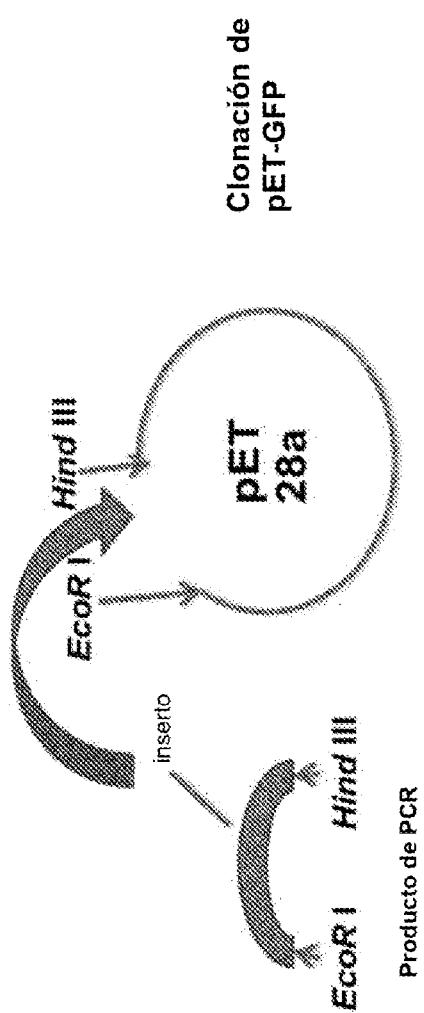


FIG. 48

## Sobreexpresión

**Transformación BL-21 de ADN de clonación de pET-GFP y tratado con IPTG 1 mM**

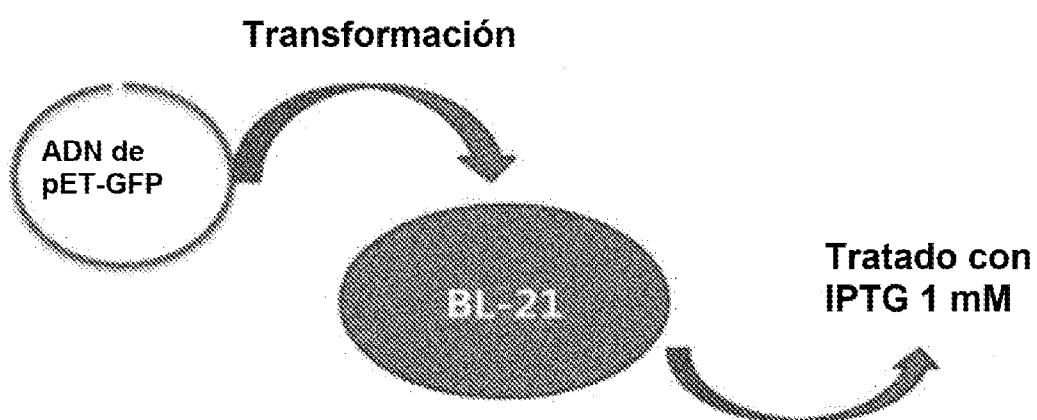
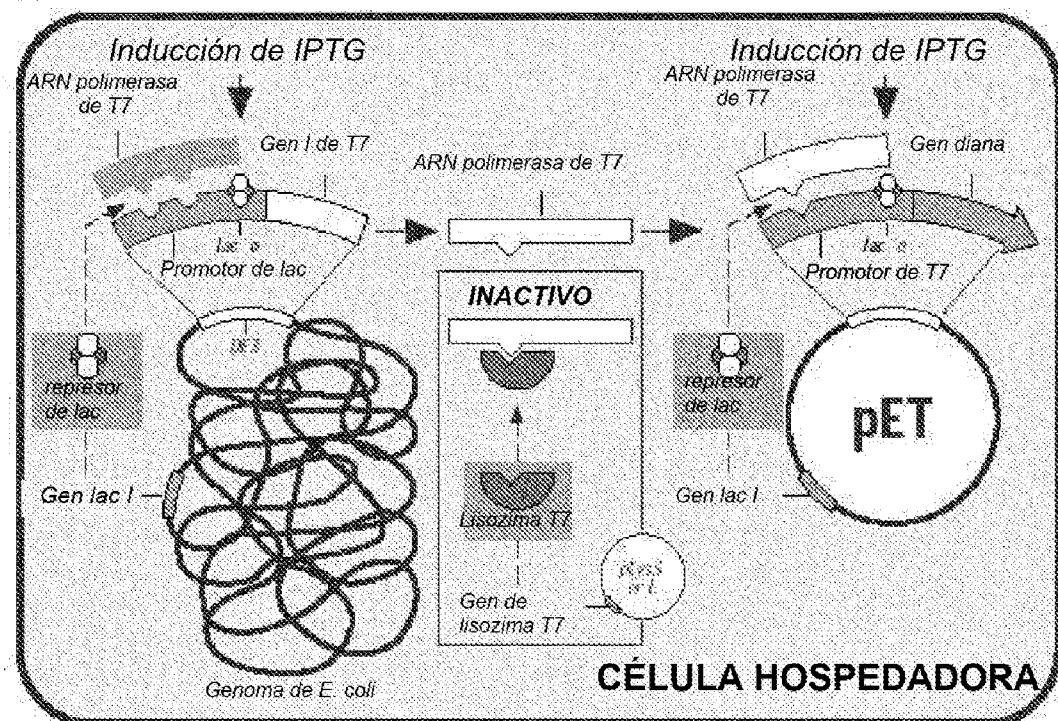
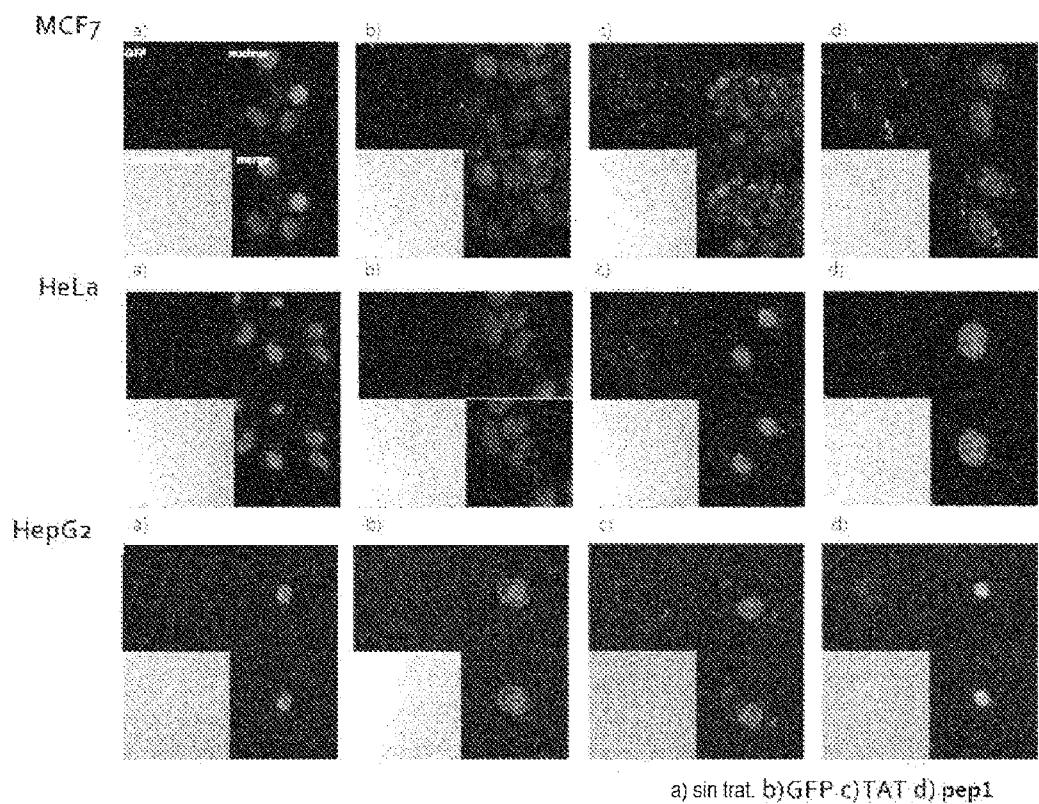


FIG. 49



ES 2 981 865 T3

FIG. 50



a) sin trat. b) GFP c) TAT d) pep1

FIG. 51

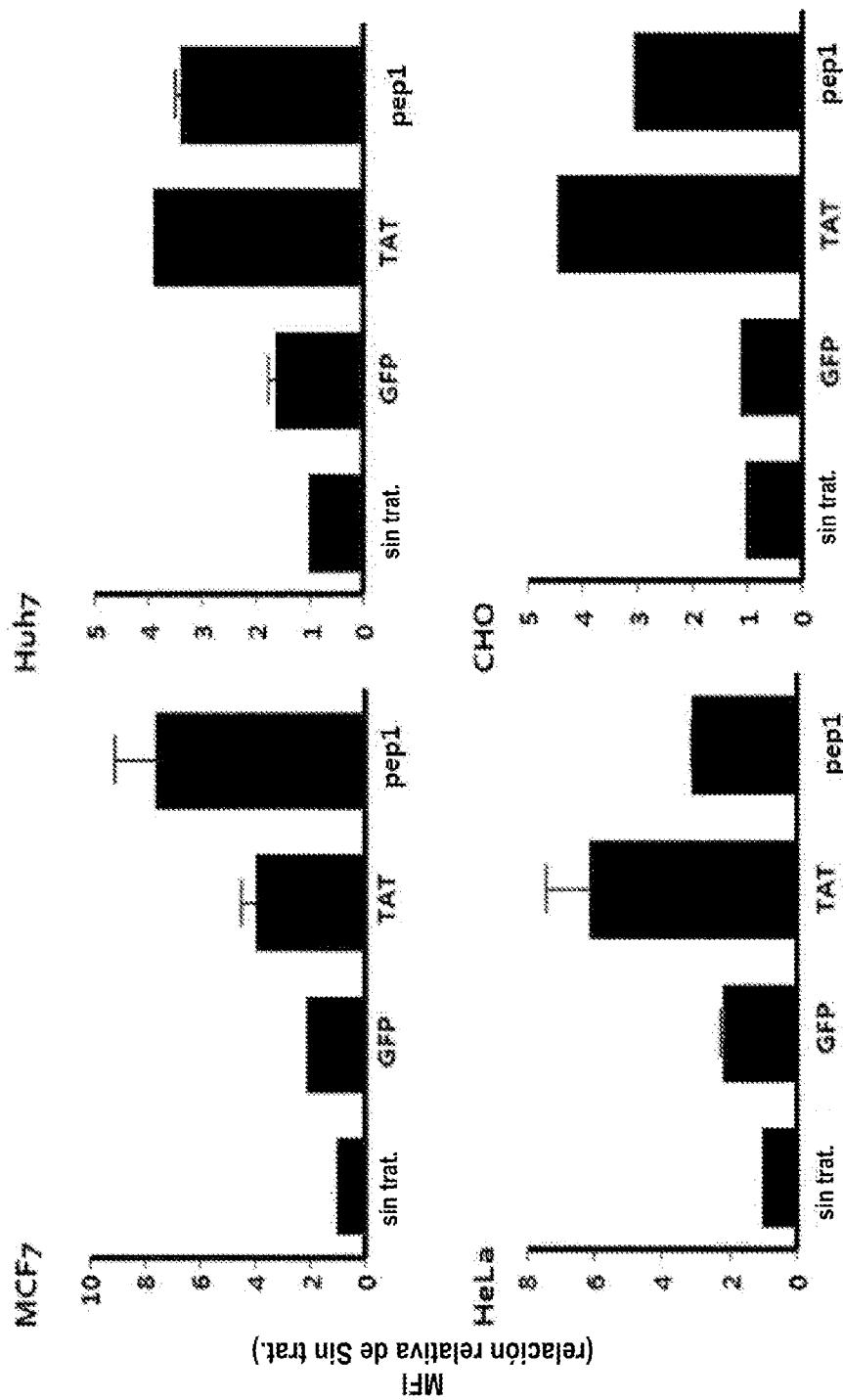


FIG. 52

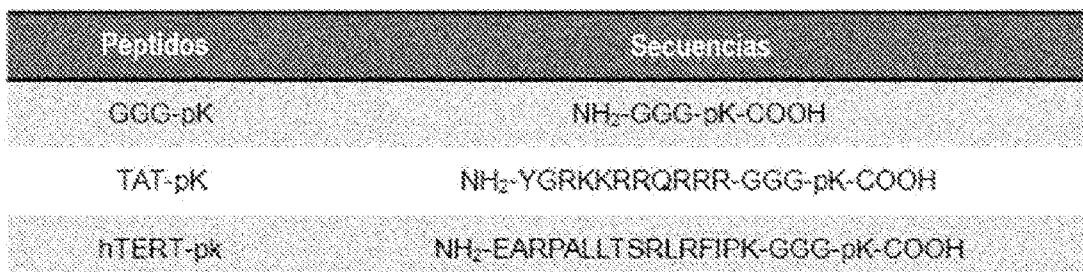
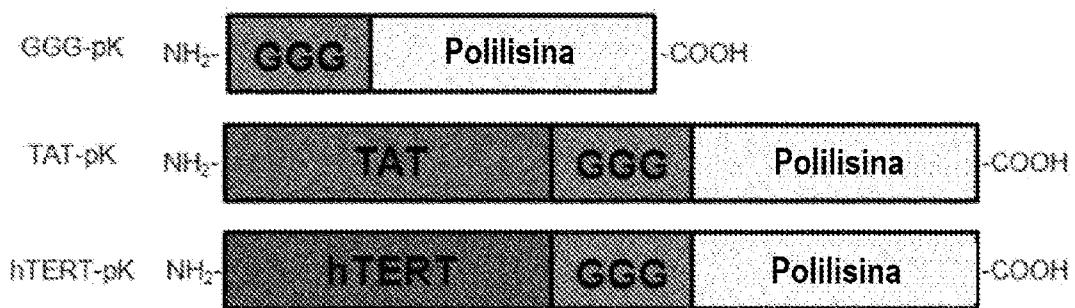


FIG. 53



ES 2 981 865 T3

FIG. 54

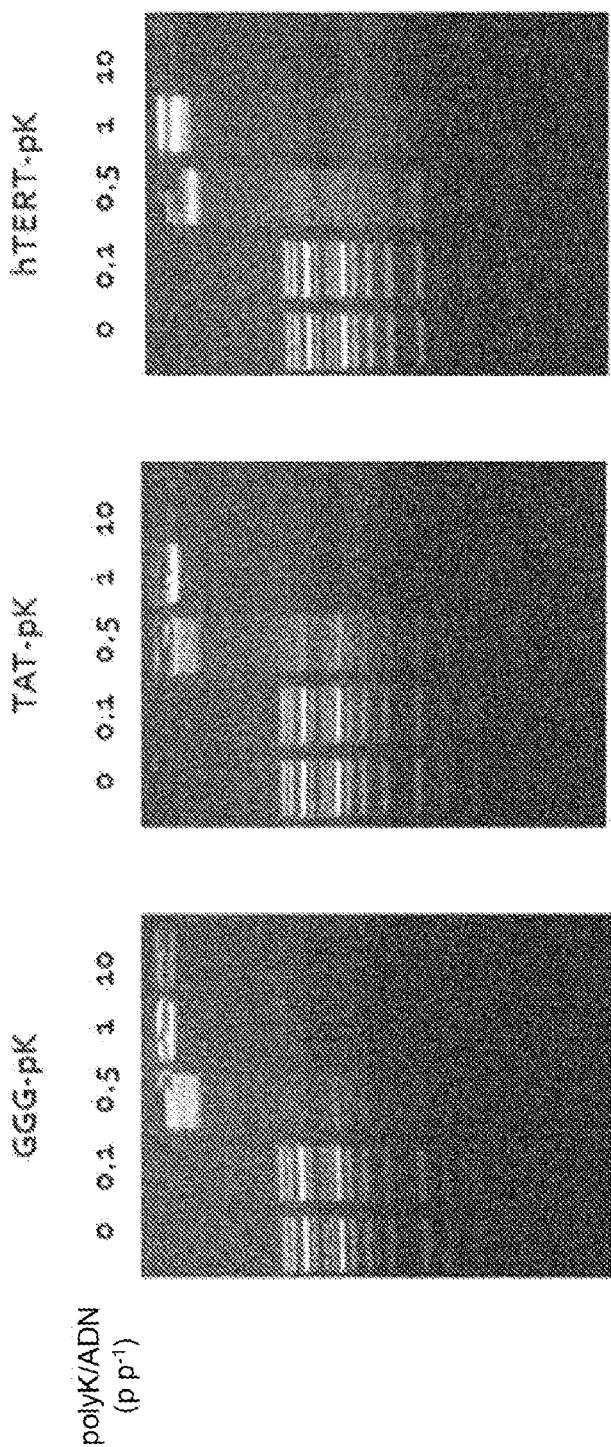
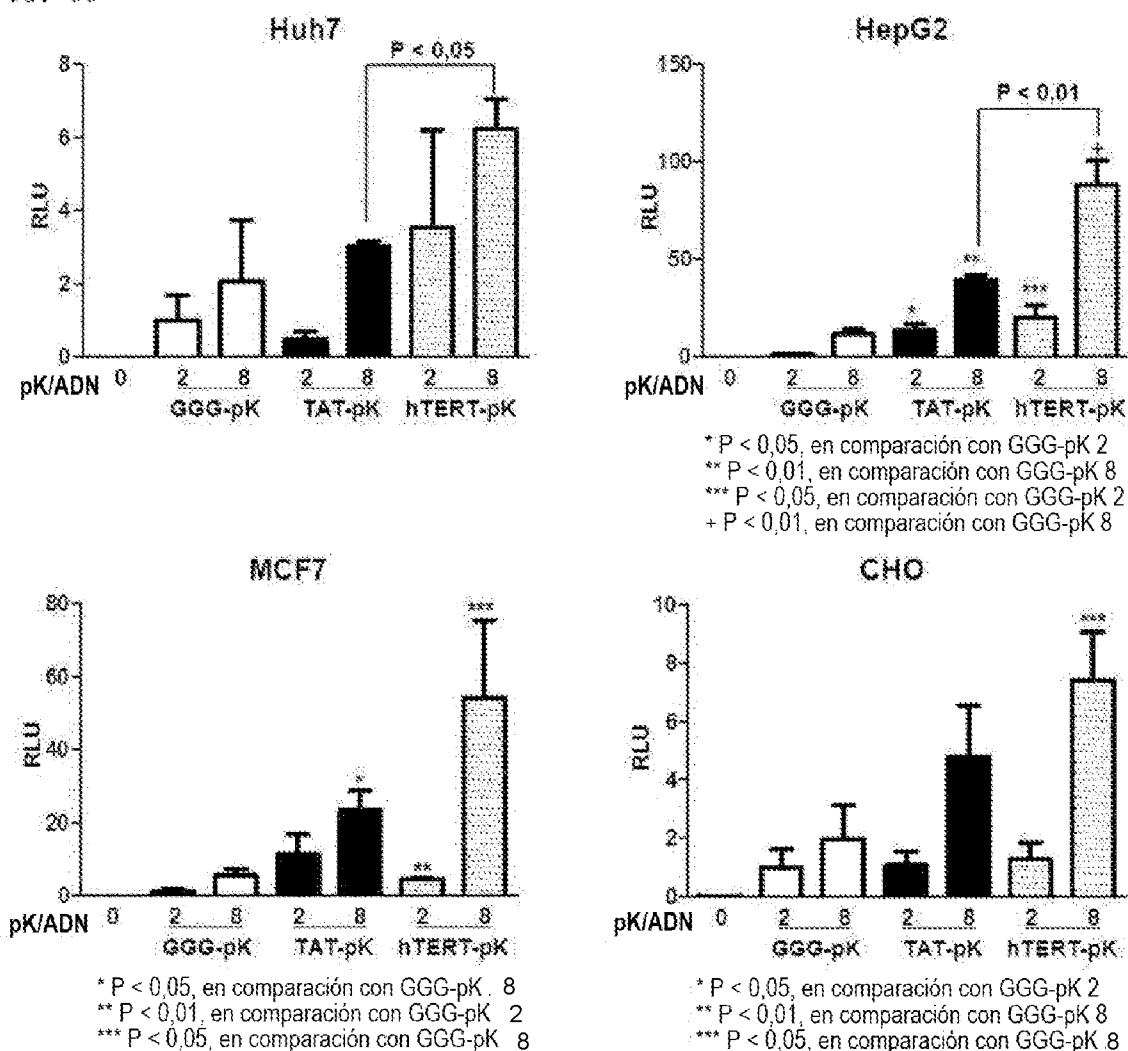


FIG. 55



# ES 2 981 865 T3

FIG. 56

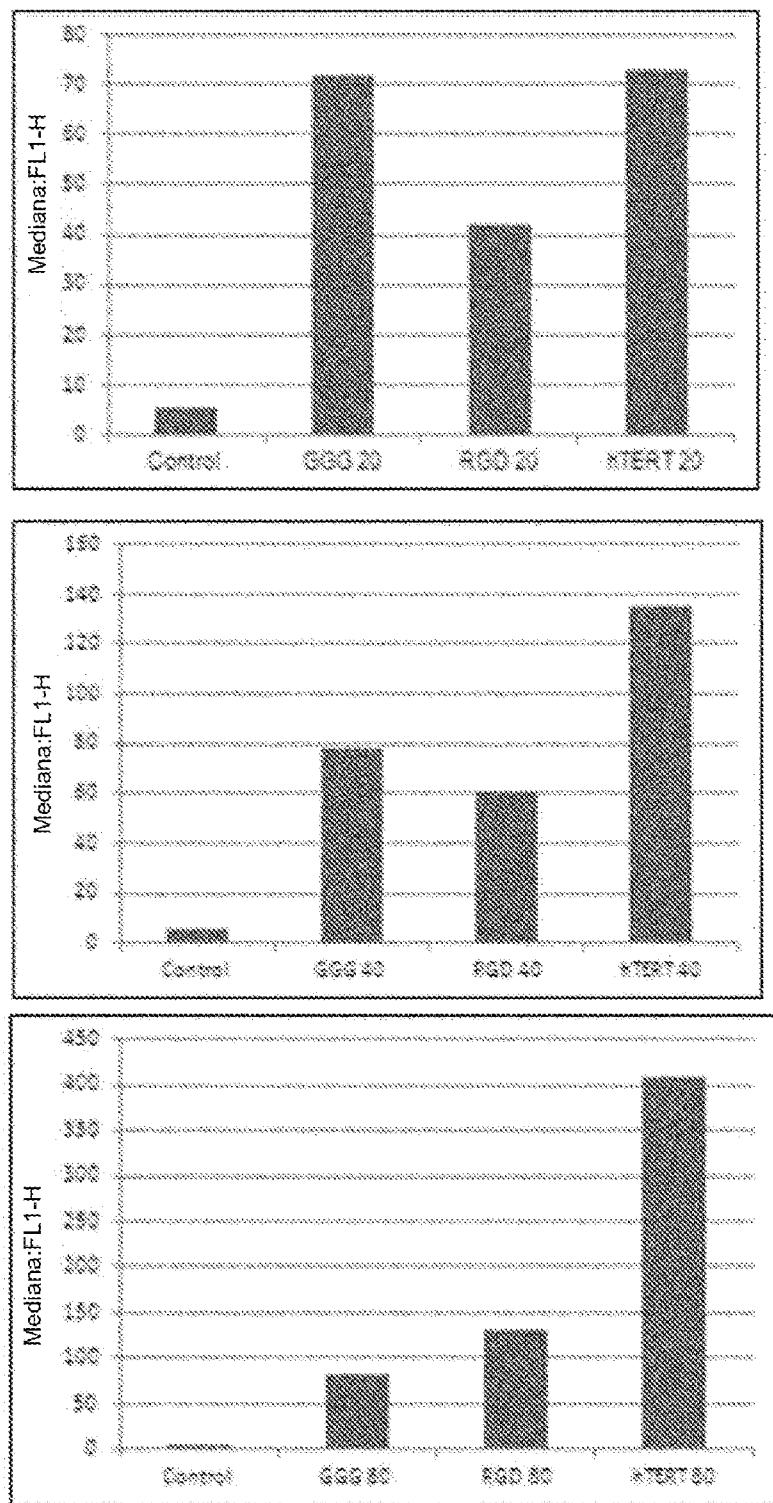


FIG. 57

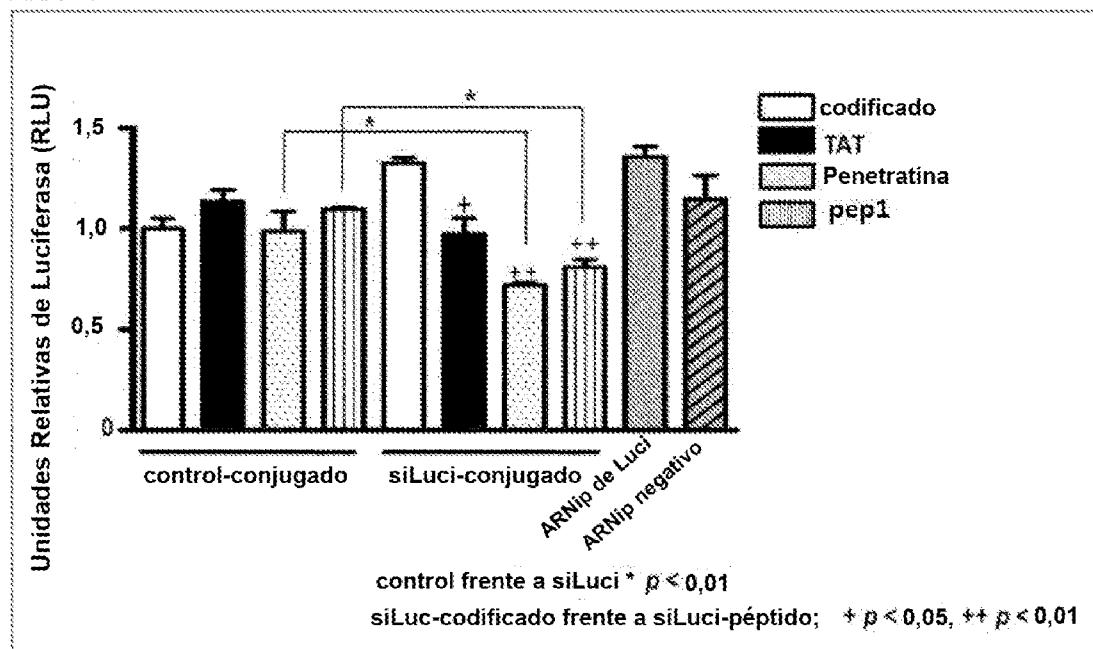


FIG. 58

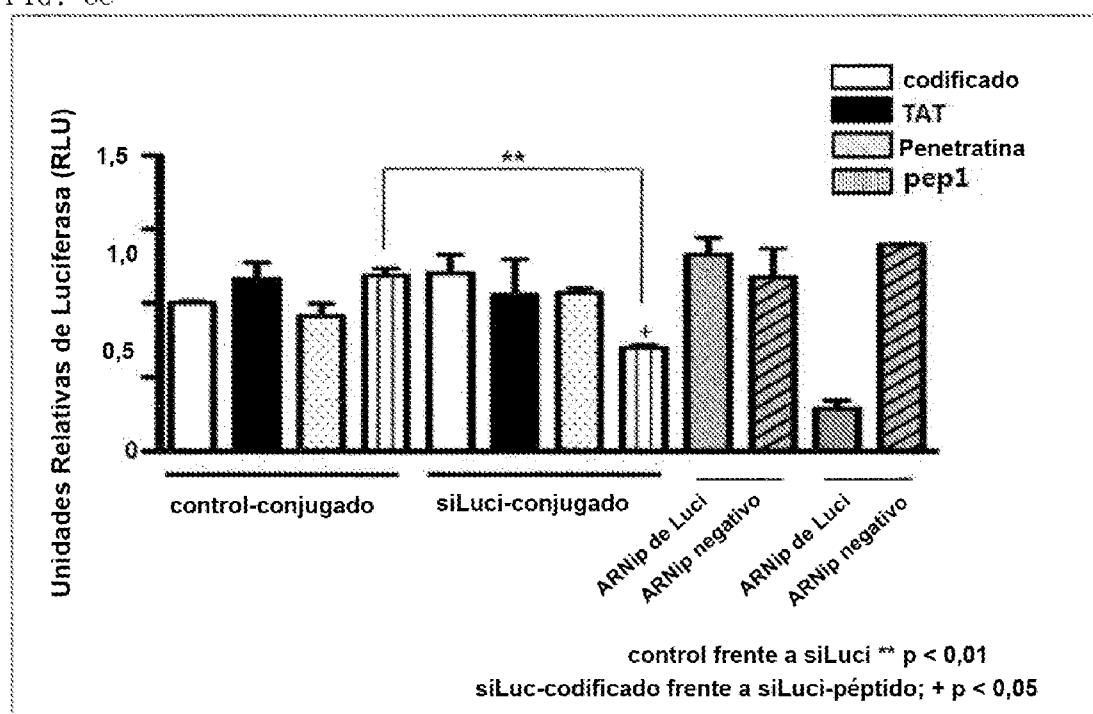
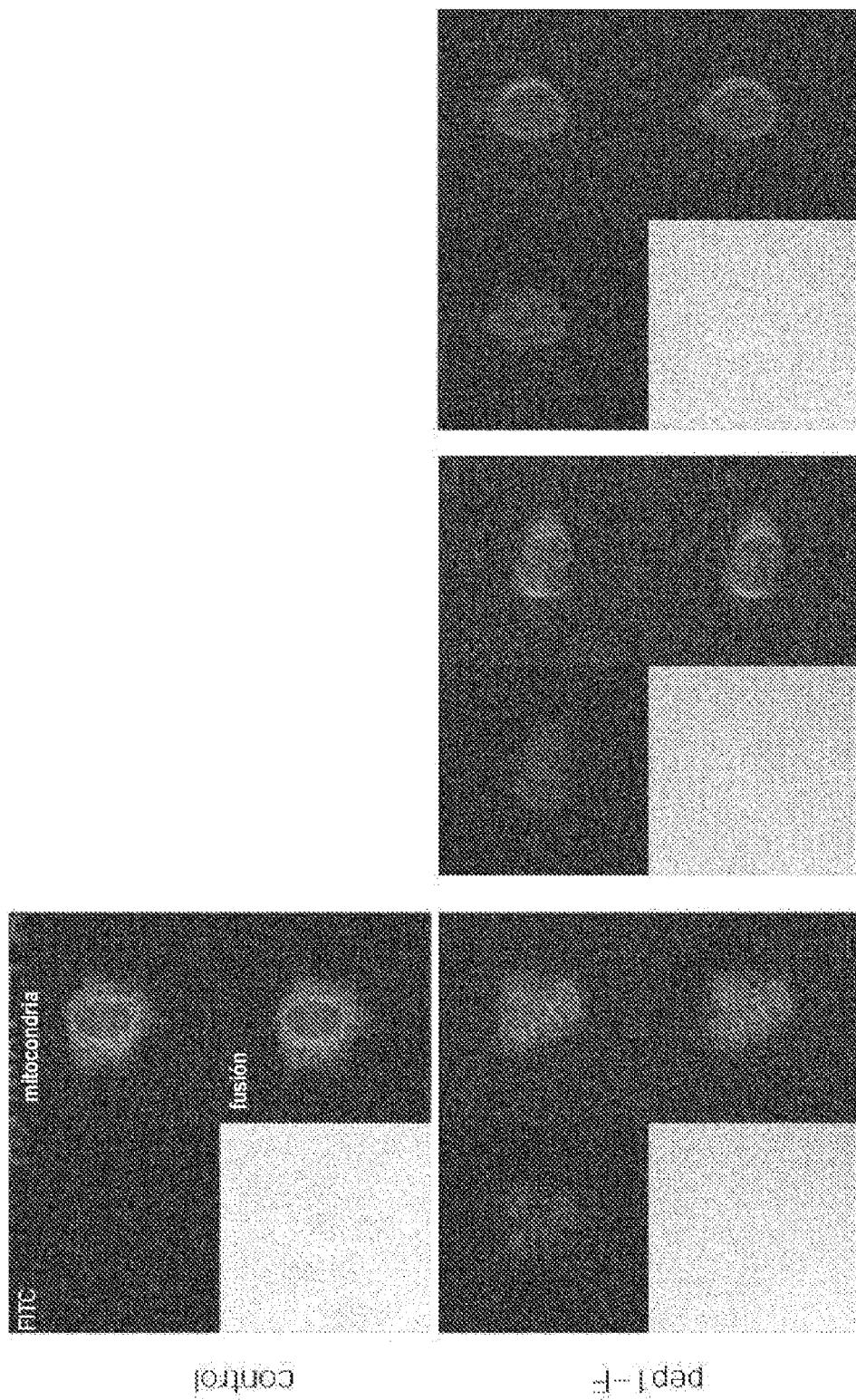


FIG. 59



ES 2 981 865 T3

FIG. 60



FIG. 61

