



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 645**

51 Int. Cl.:
C07K 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03705417 .8**

96 Fecha de presentación : **20.01.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1468012**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.10.2004**

54 Título: **Motivo de transducción biomolecular MPH-1-BTM y utilización del mismo.**

30 Prioridad: **19.01.2002 KR 10-2002-0003183**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.11.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.11.2010

73 Titular/es: **Forhumantech. Co., Ltd.**
316, Venture Incubator Center
Energy Efficiency Research
Department, 71-2, Ja
Yuseong-gu, Daejeon 305-343, KR

72 Inventor/es: **Lee, Sang-Kyou;;**
Lee, Seung-Kyou;;
Suh, Byung-Fhy;
Chae, Wook-Jin;
Kim, Jong-Bum;
Lee, Jong-Sun y
Yang, Jung-Jin

74 Agente: **Aznárez Urbieto, Pablo**

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).

MOTIVO DE TRANSDUCCIÓN BIOMOLECULAR MPH-1-BTM Y UTILIZACIÓN DEL MISMO

Descripción

5

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere al motivo de transducción biomolecular (BTM) Mph-1, un nuevo péptido de transducción biomolecular intracelular que suministra *in vivo* e *in vitro* moléculas biológicamente activas, funcionales y/o reguladoras al citosol, a los orgánulos o al núcleo de células procariotas y eucariotas, y a la utilización del mismo.

ANTECEDENTES

En general, las células vivas no son permeables a macromoléculas tales como proteínas o ácidos nucleicos. El hecho de que sólo las moléculas pequeñas puedan atravesar la membrana de las células vivas a ritmos muy lentos ha restringido las investigaciones para desarrollar fármacos para curar, prevenir o diagnosticar enfermedades utilizando macromoléculas, incluyendo por ejemplo proteínas y ácidos nucleicos. Por otra parte, dado que la mayoría de las sustancias producidas para curar, prevenir o diagnosticar determinadas enfermedades han de ser suministradas al citosol en cantidades eficientes, se han desarrollado diversos métodos para suministrar estas sustancias desde la superficie de la célula diana al interior de la misma.

Los métodos utilizados para suministrar macromoléculas al interior de las células incluyen electroporación, fusión citosólica utilizando liposomas, técnica de proyección de alta concentración de un proyectil revestido con ADN en su superficie, método de precipitación de ADN-calcio-fósforo, transfección DEAE-dextrano, infección con ácidos nucleicos víricos modificados y microinyección directa en una célula individual, etc. Además, actualmente se ha intentado suministrar macromoléculas utilizando nanopartículas *in vitro* e *in vivo*, pero sólo se están dando los primeros pasos tecnológicos y clínicos para este método. Además, estos métodos pueden suministrar macromoléculas únicamente a algunas de las células diana y su eficiencia no es suficiente para una aplicación

clínica. Por otra parte, la mayoría de estos métodos tienen efectos secundarios en las otras células.

A este respecto, la demanda del desarrollo de un nuevo método para suministrar eficazmente macromoléculas biológicamente activas al interior de las células diana *in vivo* e *in vitro* está aumentando (L.A. Sternson, Ann. N. Y. Acad. Sci., 57, 19-21 (1987)). Se ha propuesto la adición química de péptidos lipídicos (P. Hoffmann y col., Immunobiol., 177, 158-170 (1988)) o el uso de polímeros base como polilisina o poliarginina (W-C. Chen y col., Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU. 75, 1872-1876 (1978)). Además, se ha informado de que el folato de un transportador fue transferido al interior de una célula en forma de un conjugado de folato. Pero todavía no se ha confirmado si el folato fue transducido en el citosol. También se conoce una exotoxina de *Pseudomonas* como transportador (T. I. Prior y col., Cell. 64, 1017-1023 (1991)). Sin embargo, todavía no se han verificado claramente los efectos de las macromoléculas biológicamente activas suministradas al citosol y su aplicación en general. Por ello, existe una gran demanda de un método eficaz para la transducción de macromoléculas biológicamente activas en el citosol y el núcleo de células vivas.

Además, el suministro eficiente de ADN/ARN y de macromoléculas como proteínas al interior de células *in vivo* e *in vitro* se considera como una de las técnicas esenciales necesarias en el campo de la biotecnología y la ciencia médica aplicada. El suministro de ADN/ARN al interior de células actúa como un factor decisivo para las terapias génicas, para estudiar la relación de la función de una proteína codificada por el gen *in vivo* e *in vitro* y para el desarrollo de nuevos remedios utilizando ADN/ARN. Sin embargo, dado que el ADN/ARN no puede atravesar de forma eficiente la membrana celular, es muy importante aumentar la permeabilidad con el fin de utilizar genes en investigaciones básicas y clínicas.

Por esta razón se han desarrollado liposomas, nanomoléculas, vectores víricos, etc. para suministrar ADN y/o ARN al interior de una célula *in vitro* e *in vivo*, y se han examinado e investigado las posibilidades de uso de los mismos. Sin embargo aún quedan numerosos problemas sin resolver en cuanto a los efectos beneficiosos y los efectos secundarios. En particular en el caso de los liposomas, por ejemplo, debido a que sus efectos secundarios contra las células y su citotoxicidad son muy serios, su aplicación se ha limitado a investigaciones básicas. En cuanto a las nanomoléculas, aunque se les viene prestando gran atención actualmente, todavía se debería estudiar y resolver la descomposición

de partículas portadoras *in vivo*, la baja eficiencia de transducción y las respuestas inmunológicas provocadas por las moléculas. Los retrovirus tienen el problema de que no pueden infectar células que no estén en división. Los adenovirus o los virus adenoasociados también tienen una aplicación clínica
5 muy limitada. Además, estos dos tipos de vectores víricos pueden provocar respuestas inmunológicas contra las otras proteínas víricas, por lo que su eficiencia de tratamiento es muy dudosa. Por ello, se necesita un nuevo método para la transducción de ADN/ARN en el interior de células de forma eficiente y menos nociva.

10 Entre tanto se han producido proteínas reguladoras de fenómenos fisiológicos *in vivo* mediante bacterias, tales como *E. coli*, como una forma de proteína recombinante y se han empleado en el tratamiento de numerosas enfermedades. Sin embargo, es sabido que las proteínas que han sido sintetizadas en bacterias son ineficaces en las estructuras de plegado y las
15 funciones en comparación con proteínas plegadas naturalmente *in vivo*. Por ello, en muchísimas ocasiones se han intentado producir proteínas en levaduras, células de insecto o células animales y hacer que las proteínas producidas en bacterias estuvieran replegadas utilizando animales transgénicos. Sin embargo, estos métodos requieren estudios más profundos y una total comprensión de
20 muchos pasos intermedios biológicos celulares moleculares y sus eficiencias de transducción son muy bajas. Además genera una pésima relación coste-eficacia.

A consecuencia de esta demanda se ha informado sobre varios PTD (dominios de transducción de proteínas). Entre éstos, el más estudiado ha sido
25 la proteína Tat, que es una proteína vírica del virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1). Se sabe que la proteína Tat actúa de forma más eficiente cuando contiene los aminoácidos 47 a 57 (YGRKKRRQRRR), donde se concentran los aminoácidos con carga positiva, que la proteína continua de longitud completa de 86 aminoácidos (Fawell S. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.
30 UU. 91, 664-668 (1994)). Otros ejemplos de PTD son los aminoácidos 267 a 300 de la proteína del virus del herpes simplex de tipo 1 (VHS-1) (Elliot G. y col., Cell, 88, 223-233 (1997)), los aminoácidos 339 a 355 de la proteína de Antennapedia (ANTP) de *Drosophila* (Schwarze S.R. y col., Trends Pharmacol Sci. 21, 45-48 (2000)) y una combinación artificial de aminoácidos con carga
35 positiva. En relación con los PTD arriba mencionados, nosotros, los inventores, hemos comprobado que éstos contienen lisina y arginina en abundancia, considerándose que la arginina desempeña un papel muy importante en la

transducción de biomoléculas en células. Y esto estaba respaldado por el documento publicado que reveló las actividades de transducción de péptidos artificiales consistentes en aminoácidos con carga positiva (Laus R. y col., Nature Biotechnol. 18, 1269-1272 (2000)).

5 Existen 2 (dos) hipótesis con respecto al mecanismo de transducción de macromoléculas en el interior de células cuando se utilizan PTD. La primera consiste en que los PTD destruyen la membrana plasmática y transmiten las moléculas a través de ésta. La segunda consiste en que el PTD utiliza la
10 membrana plasmática para formar una nueva vesícula que puede transportar las moléculas al interior de las células. Además, de acuerdo con algunas suposiciones, los PTD tienen características estructurales que pueden formar nuevos canales en la membrana (Becker-Hapak M. y col., 2001, Jul:24(3): 247-256).

 No obstante, experimentos realizados con aminoácidos combinados artificialmente con 12 argininas y 12 lisinas sugieren que la hipótesis de que la
15 presencia de lisina y arginina en posiciones específicas induce la formación de nuevos canales puede estar equivocada (Rothbard JB. y col., Nature Med. 200 Nov:6(11): 1253-1257). Además, teniendo en cuenta el hecho de que únicamente las proteínas que estaban unidas de forma covalente o no covalente
20 con los PTD fueron transferidas a través de la membrana celular, la hipótesis de que los PTD destruyen la membrana plasmática y desplazan las moléculas a través de ésta no era aceptable. Por otra parte, de acuerdo con nuestros estudios, los PTD presentaban capacidad de transducción tanto a 37°C como a 4°C, lo que sugería que los PTD no produjeron nuevos canales ni formaron
25 nuevas vesículas.

 Recientemente se ha desarrollado un nuevo tipo de PTD, el MTS. Su secuencia de aminoácidos se ha sintetizado en base al péptido señal del FCF (factor de crecimiento fibroblástico), sabiéndose que los aminoácidos del péptido señal tienen características bastante diferentes a las de los aminoácidos de
30 PTD, como son las siguientes: (a) 3-5 argininas o lisinas están presentes de forma no continua junto con serina o treonina y no hay ácido glutámico ni ácido aspártico; (b) uno o más aminoácidos básicos y 6-12 grupos de aminoácidos hidrófobos; (c) presencia abundante de serina, treonina o aminoácidos hidrófobos pequeños y la glutamina y el ácido aspártico están presentes en
35 pequeñas cantidades; (d) 10 aminoácidos aleatorios están presentes entre 1 ó 2 aminoácidos que están reunidos. Por consiguiente, se considera que el MTS

tiene características diferentes en comparación con los PTD usuales. Es decir, el MTS tiene una combinación de aminoácidos diferente.

A este respecto hemos intentado descubrir un nuevo mecanismo para la transducción de PTD y factores decisivos para la combinación de aminoácidos consistente en PTD en base a las características descubiertas de los dos tipos de PTD arriba mencionados y en base a los resultados de nuestras investigaciones preliminares. A continuación se indican dos nuevas hipótesis derivadas de los factores decisivos y los requisitos para el desarrollo de un nuevo tipo de PTD de la presente invención: 1) teniendo en cuenta que i) las proteínas desplegadas se transducen con mayor eficiencia que las completamente plegadas, que ii) una vez que las proteínas desplegadas son transmitidas al interior de los orgánulos o células ya no son eliminadas de los orgánulos o células y que iii) los PTD no utilizan receptores para llevar a cabo una endocitosis o fagocitosis, parece que los PTD utilizan canales presentes en la superficie de la célula, por consiguiente existe una gran demanda de aminoácidos hidrófobos, como alanina y valina; 2) dado que los PTD transmiten eficientemente moléculas al interior del núcleo, su función puede ser similar a la de los factores de transcripción. Por consiguiente, podrían encontrarse frecuentemente PTD en factores de transcripción. Y los PTD pueden utilizar canales similares a translocones que transmiten proteínas al interior de los orgánulos.

En base a estas dos hipótesis y requisitos, hemos buscado en el banco de genes. Teniendo en cuenta el hecho de que los PDT convencionales tienen abundantes lisinas y argininas, seleccionamos aproximadamente 10.000 genes candidatos primarios. Entre éstos se eligieron 500 aplicando los requisitos de péptido señal y se confirmó que 100 de los 500 genes contenían alanina y valina. Finalmente, se seleccionaron 20 genes aplicando los factores requeridos para los factores de transcripción y después se probaron las eficiencias de transducción. Además se expresaron y purificaron proteínas de fusión de cada uno de estos PTD candidatos y β -galactosidasa, y las funciones de estas proteínas se determinaron utilizando células T Jurkat. Como consecuencia, se comprobó que la secuencia de aminoácidos 858 a 868 de Mph-1 (número de banco de genes: U63386), un factor de transcripción de ratón, sorprendentemente tiene una importante capacidad de transducción, y se denominó Mph-1 BTM (motivo de transducción biomolecular).

De este modo completamos la presente invención con el descubrimiento de que los aminoácidos 858 a 868 de Mph-1 presentan unas características excelentes como péptido de transducción biomolecular intracelular, lo que permite suministrar de forma eficiente cualquier proteína diana, ácido nucleico, lípido, carbohidrato o compuesto químico al interior del citosol y al núcleo *in vivo* e *in vitro*. Además hemos verificado que las macromoléculas deseadas pueden ser transducidas en órganos y/o células específicos *in vivo* e *in vitro* empleando un ectodominio del ligando que se une al receptor presente sobre la superficie de las células o de los órganos en los que se transducen las macromoléculas, el sitio de corte de MMP y Mph-1 BTM. También hemos descubierto que un vector de expresión que tiene 5 (cinco) secuencias de ADN o ARN sucesivas que se unen específicamente a dominios de unión de ADN o ARN, se puede transducir *in vivo* e *in vitro* en los órganos o células específicos utilizando el Mph-1 BTM y empleando los dominios de unión de ADN o ARN (DBD y/o RBD) que se unen al ADN o ARN a transducir, pudiendo incluir el vector de expresión elementos reguladores que comprenden un promotor que induce una expresión genética selectivamente en órganos, tejidos o células específicos. Además, de acuerdo con la presente invención es posible reformar la estructura de una proteína recombinante para que tenga la misma estructura de plegado y las mismas funciones que la proteína natural transfiriendo las proteínas sintetizadas en bacterias a las células animales adecuadas y aislándolas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El objeto de esta invención consiste en proporcionar un nuevo motivo de transducción biomolecular Mph-1-BTM (SEQ. ID No.: 1) que transduce eficazmente *in vivo* e *in vitro* macromoléculas reguladoras funcionales biológicamente activas a través de numerosas vías de administración, incluyendo las vías intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, oral, nasal, subcutánea, intradérmica, mucosa y por inhalación, y en proporcionar el vector de expresión recombinante que lo incluye.

Otro objeto de esta invención consiste en un procedimiento para la producción de dicho motivo de transducción biomolecular que comprende la provisión de un vector de expresión recombinante que comprende el Mph-1-BTM.

Esta invención se puede utilizar para proporcionar la proteína de fusión del motivo de transducción molecular y una proteína deseada mediante la transformación de una célula huésped adecuada con el vector de expresión recombinante.

- 5 Esta invención se puede utilizar para proporcionar un método para la transducción *in vivo* e *in vitro* de macromoléculas moduladoras funcionales biológicamente activas en el citosol o en el núcleo de procariotas o eucariotas utilizando el Mph-1-BTM.

- 10 Otro objeto de esta invención consiste en la utilización del Mph-1 BTM en terapias génicas y en el tratamiento de enfermedades empleando proteínas.

Un modo de utilizar esta invención consiste en proporcionar una vacuna recombinante que incluye el Mph-1 BTM y una vacuna de ADN o ARN, o en suministrar genes para terapias génicas utilizando el Mph-1-BTM.

- 15 Otro modo de utilizar esta invención consiste en proporcionar una nueva vacuna utilizando ADN o ARN o antígenos proteínicos específicos de patógenos, como virus, bacterias, mohos y diversas células cancerosas.

Otro modo de utilizar esta invención consiste en proporcionar una medicina genética de ADN o ARN que regula actividades biológicas *in vivo* e *in vitro* utilizando el Mph-1-BTM.

- 20 Otro modo de utilizar esta invención consiste en proporcionar fármacos proteínicos para el tratamiento, el diagnóstico y/o la prevención de enfermedades, siendo reformadas las estructuras de plegado de las proteínas para que tengan la misma estructura y las mismas funciones que las proteínas naturales.

- 25 Para lograr estos objetos, la invención proporciona un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos (SEQ. ID No.: 1) para transducir *in vivo* e *in vitro* macromoléculas moduladoras funcionales biológicamente activas en el citosol o en el núcleo de procariotas o eucariotas.

- 30 Además, esta invención se puede utilizar para proporcionar un ADN que codifica un péptido de transducción biomolecular intracelular, un vector de expresión de ADN recombinante que comprende una proteína diana que codifica ADN, y una *E. coli* transformada de DH5a Mph-1 (KCCM 10345) utilizando el vector.

Además, esta invención se puede utilizar para proporcionar un método para la transducción de un complejo del péptido (o el péptido fusionado con una proteína diana) y una molécula reguladora funcional biológicamente activa (por ejemplo un fármaco químico o un profármaco químico) a través de numerosas
5 vías de administración, incluyendo las vías intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, oral, nasal, subcutánea, intradérmica, mucosal y por inhalación, *in vivo* e *in vitro* en el citosol o en el núcleo de procariotas o eucariotas. A continuación se describe esta invención en detalle.

En esta especificación y reivindicaciones, el concepto “molécula
10 moduladora funcional biológicamente activa” se refiere a una molécula que regula cualquier fenómeno fisiológico, incluyendo por ejemplo ADN, ARN, proteínas, lípidos, carbohidratos y compuestos químicos.

Además, el concepto “macromolécula” incluye proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos y compuestos químicos.

Además, un péptido de transducción biomolecular de “derivado de Mph-1-BTM” se define como un péptido o su fragmento activo que mantiene actividades de transducción de Mph-1-BTM, donde parte de los aminoácidos se han eliminado o sustituido o al menos parte de los aminoácidos se han sustituido por aminoácidos en forma L o D, o la estructura de los aminoácidos
15 20 está reformada para aumentar la estabilidad *in vivo* o *in vitro*.

Además, una “proteína de fusión” se define como una proteína fusionada con un péptido de transducción biomolecular de Mph-1-BTM directamente a través de un enlace químico, físico, covalente o no covalente, o indirectamente a través de cualquier mediador.

Además, un “compuesto químico” se define como una sustancia química que regula una función celular, como un fármaco anticanceroso, un fármaco para enfermedades inmunológicas, un fármaco antiviral y un factor de crecimiento, desarrollo o diferenciación de un animal.

En esta invención, un “péptido de transducción biomolecular” se define
30 como un péptido correspondiente a los aminoácidos 858 a 868 del N-término del inhibidor de transcripción de ratón Mph-1 (M. J. Alkema y col., Genes Dev. 12), 226-240 (1997)), considerándose que las argininas y alaninas interactúan con receptores de canal de transducción biomolecular en la superficie de la célula.

Además, esta invención se refiere a un péptido correspondiente a la secuencia de aminoácidos SEQ. ID No.: 1, en la que una parte de aminoácido que incluye arginina, valina y alanina se ha sustituido por aminoácidos funcional y estructuralmente similares, por ejemplo valina, etc.'

5 Esta invención también proporciona un vector de expresión que comprende: i) ADN/ARN que codifica un péptido de transducción biomolecular correspondiente a la secuencia de aminoácidos SEQ. ID No.: 1, o ADN/ARN que codifica un péptido de transducción biomolecular correspondiente a una
10 una proteína deseada y/o moléculas reguladoras funcionales biológicamente activas para introducirlas en las células. Este vector de expresión recombinante incluye preferentemente una o más secuencias tag, tal como una serie de codones de histidina, hemaglutinina, Myc o proteína de unión de maltosa y así sucesivamente, con el fin de facilitar la purificación. Además, en el vector se
15 puede introducir un componente de fusión, como una lisina ARN polimerasa, para aumentar la solubilidad. También se pueden incorporar uno o más aminoácidos de glicina y espaciadores, incluyendo aminoácidos AYY, para la flexibilidad de la proteína codificada por los genes y para la estabilidad de la proteína de fusión. Además, en el vector de expresión se puede insertar un sitio
20 de corte reconocido por una proteasa presente específicamente en un determinado orgánulo intracelular con el fin de eliminar una parte no deseada de la proteína de fusión o para separar BTM y la molécula cargo, la secuencia reguladora de expresión y un marcador para controlar la transducción o un gen indicador, consistiendo la secuencia reguladora de expresión en un dominio que
25 comprende un promotor o un potenciador específico de células, tejidos u órganos en los que se transduce el ADN o ARN deseado.

En una realización, un vector de expresión recombinante que incluye el péptido de transducción biomolecular intracelular de pMph1- β -gal comprende un ADN que codifica un péptido correspondiente a la secuencia de aminoácidos
30 SEQ. ID No.: 1, 6 (seis) codones de histidina sucesivos para purificar las proteínas deseadas expresadas en las células huésped, la secuencia Asp-Asp-Asp-Asp-Lys a cortar con enteroquinasa o la secuencia Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly a cortar con Tev y un ADN que codifica un marcador de β -galactosidasa para la detección de la proteína deseada en las células.

35 El vector pMph1- β -gal de esta invención se puede obtener fácilmente mediante métodos PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usuales

utilizando el vector pIND/lacZ (que se puede obtener de Invitrogen Inc.) como molde. Además, en esta invención el vector de expresión recombinante de transducción biomolecular se produce cortando el gen de β -galactosidasa con una enzima de restricción adecuada y sustituyéndolo por los ADNs que codifican la proteína deseada. La proteína deseada consiste en una proteína reguladora funcional biológicamente activa o una fusión de ésta, que está unida química o físicamente al ectodominio del ligando que se une específicamente a un receptor de una célula, tejido u órgano en el que se introduce la proteína deseada, con el fin de transducirla en la célula, tejido u órgano específico. Este ligando o receptor incluye proteínas, lípidos, carbohidratos, compuestos químicos o complejos de éstos, pero no está limitado a los mismos. Si la proteína deseada es una cualquiera de las proteínas específicas víricas seleccionadas de entre un grupo consistente en VIH, VHB, VHC y gripe, o una proteína específica tumoral expresada en células tumorales incluyendo células cancerosas hepáticas o células cancerosas estomacales, el vector de expresión recombinante de esta invención induce CTL (leucocito citotóxico) mediante la conversión de la vía de procesamiento antigénico de CPH de clase II a CPH de clase I. En este caso, el vector de expresión recombinante comprende preferentemente ADNs que codifican una o más ubiquitinas.

En una realización de la presente invención, la proteína deseada se aísla y purifica utilizando el vector de expresión recombinante. Específicamente, después de transformar una célula huésped adecuada, por ejemplo *E. coli*, con el vector de expresión recombinante de esta invención, la proteína deseada se aísla utilizando la interacción entre polihistidina y Ni^{2+} -NTA. Además, en otra realización, en un método para transducir moléculas reguladoras funcionales la transducción se realiza de forma más eficaz en el citosol, los orgánulos o el núcleo cultivando el vector de expresión recombinante de la presente invención junto con moléculas reguladoras funcionales biológicamente activas.

En otra realización se proporciona un método para la transducción de biomoléculas de la siguiente manera: i) preparación de un vector de expresión recombinante que comprende ADNs que codifican una proteína de unión a ADN o ARN que se une selectivamente a la DBS/RBS (secuencia de unión a ADN o ARN) del ADN o ARN deseado; ii) obtención de un complejo proteína-ADN o ARN mediante la combinación de la secuencia de ADN o ARN deseada, que contiene una secuencia de ADN o ARN diana que se une a la proteína de unión

de ADN o ARN; y iii) cultivo mixto del complejo de proteína-ADN o ARN con un medio de cultivo celular para transducir el ADN o ARN deseado en las células.

En otra realización, se proporciona un método para transducir biomoléculas que incluye los siguientes pasos: i) obtención de un complejo
5 mediante la reacción de proteínas de fusión, que se activan a través de un inductor de unión, con el compuesto químico deseado, consistiendo la proteína de fusión en una fusión entre el péptido de transducción biomolecular de Mph-1-BTM y la proteína deseada; y ii) cultivo mixto del complejo obtenido junto con un medio de cultivo celular para transducir los compuestos químicos deseados en
10 las células. Los inductores de unión arriba indicados incluyen reactivos de unión, por ejemplo BMOE (Pierce Cat. nº 2323), DSP (Pierce Cat. nº 22585), que unen el péptido de transducción biomolecular o la proteína de fusión entre el péptido de transducción y la proteína deseada con ADN o ARN, carbohidratos, lípidos, proteínas o compuestos químicos directa o indirectamente a través de enlaces
15 químicos, físicos, covalentes o no covalentes.

En otra realización, se proporciona un método para producir un fármaco proteínico que incluye los siguientes pasos: i) aislamiento y purificación de una proteína de fusión entre el péptido de transducción biomolecular de Mph-1 BTM y la proteína deseada que controla la respuesta biológica *in vivo*, después de
20 expresarlos masivamente a partir de bacterias; y ii) transferencia de la proteína de fusión en las células que producen la proteína deseada en estado natural, o en las células que llevan a cabo un procesamiento y modificación de la proteína para replegarla con el fin de que ésta presente la estructura de plegado y las funciones naturales.

Además, en esta invención, cuando se transduce el ADN o ARN o compuesto químico deseado en células, éstos se combinan con la proteína de fusión entre el péptido de transducción biomolecular y la proteína deseada, pudiendo formar la proteína deseada un complejo de transducción mediante la unión del ectodominio de un ligando que interactúa selectivamente con un
25 receptor que se expresa en células, órganos y tejidos específicos, o mAb o su mutante que se une específicamente con el ligando o el receptor, por ejemplo un fragmento Fab, un fragmento F(ab') o un Fv de cadena simple o un mAb humanizado.
30

Por consiguiente, esta invención también proporciona un método para la
35 transducción de un ADN o un ARN deseado en células incluyendo los siguientes

pasos: i) preparación de un primer vector de expresión recombinante que incluye un ADN o ARN deseado a transducir en células, al menos una secuencia de ADN o ARN continua con la que se une específicamente una proteína de unión de ADN o ARN y una secuencia reguladora de expresión unida funcionalmente; ii) preparación de un segundo vector de expresión recombinante que incluye un péptido de SEQ. ID No.: 1, ADN o ARN que codifica proteína de unión de ADN o ARN que se une selectivamente con la secuencia de ADN o ARN del primer vector de expresión recombinante del paso i); iii) recogida de la proteína de fusión expresada en las células huésped utilizando el segundo vector de expresión recombinante; iv) obtención de un complejo de la proteína de fusión y el ADN o ARN deseado mediante unión de la proteína de fusión de iii) y el primer vector de expresión recombinante de i); v) mezcla del complejo con las células a las que se transfiere el ADN o ARN y se mezcla cultivando las células. Como factor regulador funcional biológicamente activo en esta invención se puede utilizar una citoquina, como interleuquina-4, interleuquina-2, interleuquina-12 o γ -interferón, quimioquinas o EGF.

Preferentemente, la proteína deseada de esta invención se somete a una modificación post-traducción, por ejemplo ubiquitinación, fosforilación, acilación grasa, como palmitoilación, miristoilación o farnesilación, después de su traducción. En particular, durante el proceso de acilación se puede emplear una parte de la secuencia de aminoácido proteínico Lck (Met-Gly-Cys-Val-Cys-Ser-Ser-Asn-Pro-Glu-Asp-Asp-Trp-Met-Glu-Asn).

Además, cuando se transduce una molécula reguladora funcional biológicamente activa en el citosol, los orgánulos o el núcleo de una célula, es preferible utilizar un agente lisosomotrófico seleccionado de entre el grupo consistente en cloroquina, monensina, amantadina y metilamina para aumentar la seguridad estructural y funcional de la molécula. La molécula reguladora funcional biológicamente activa se transduce en el citosol, los orgánulos o el núcleo de una célula a través de numerosas vías de administración, por ejemplo vía intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, oral, nasal, subcutánea, intradérmica, mucosal y por inhalación, junto con el Mph-1-BTM.

Dado que el péptido de transducción molecular de la presente invención es muy pequeño, la intervención biológica en la molécula activa se reduce significativamente al mínimo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Figura 1A: ilustra el constructo del vector de expresión pMph1- β -gal.
- Figura 1B: imágenes en gel de agarosa después de tratar el vector de la figura 1A con enzimas de restricción.
- 5 Figura 2: tinción con azul de coomassie de las proteínas de fusión purificadas expresadas a partir del vector pMph1- β -gal.
- Figura 3A: muestra la actividad de la proteína de fusión de Mph1 y β -gal.
- Figura 3B: resultado de un análisis de actividad enzimática que demuestra que la proteína de fusión de Mph1 y β -gal ha sido transducida de
10 forma eficiente en las células.
- Figura 4A: ilustra el constructo del vector de expresión pTat- β -gal.
- Figura 4B: muestra los resultados de análisis de actividad enzimática de β -gal que demuestran que la proteína de fusión de Mph1 y β -gal ha sido transducida en la célula de forma más eficiente que la proteína de fusión de Tat y β -gal.
15
- Figura 5A: ensayo de β -gal de Mph-1 BTM que representa sus efectos de transducción *in vivo*.
- Figura 5B: representa la eficiencia de transducción de eGFP en células esplénicas utilizando Mph-1 BTM.
- 20 Figura 5C: representa la transducción de β -gal en células T en sangre a través de numerosas vías de administración.
- Figura 6A: ilustra el vector de expresión recombinante de Mph-1- β -gal-B7.1.
- Figura 6B: representa los resultados de análisis FACS, que muestran que la molécula deseada de β -gal está transducida específicamente en células T.
25
- Figura 7: ilustra el constructo del vector de expresión recombinante de pMph-1-Gal4.

- Figura 8: ilustra el constructo del vector de expresión recombinante de pCD8- ξ -5XGBS (secuencia de unión de Gal4).
- Figura 9A: representa la transducción del vector de expresión de pCD8- ξ -5XGBS en células T utilizando Mph-1-BTM.
- 5 Figura 9B: representa la transducción del vector de expresión de pCDB- ξ -5XGBS en células T y esplenocito en sangre *in vivo* y la expresión del mismo.
- Figura 10A: ilustra el constructo del vector de expresión de pMph-1-Gal4-B7.1.
- Figura 10B: ilustra el constructo del vector de expresión de pLCD8- ξ -5XGBS.
- 10 Figura 10C: representa la transducción específica de células T del vector de expresión pCD8- ξ -5XGBS utilizando Mph-1-BTM.
- Figura 10D: representa la expresión específica en células T del vector de expresión pLCD8- ξ -5XGBS utilizando Mph-1-BTM.
- Figura 11A: muestra la estructura de un enlace químico sensible al pH entre
15 Mph-1-BTM y TMC, un inmunosupresor.
- Figura 11B: muestra la transducción de TMC en células T Jurkat mediante Mph-1-BTM.
- Figura 12: ilustra el constructo del vector de expresión de pMph-1-zA1A2(a) y pMph-1-CTLA4(b).
- 20 Figura 13: tinción con azul de coomassie de proteínas de fusión purificadas de pMph-1-zA1A2(a) y pMph-1-CTLA4(b).
- Figura 14: muestra la transmisión de proteínas β -gal en células callus utilizando Mph-1-BTM.
- Figura 15: representa la transducción de proteínas β -gal en bacterias,
25 salmonela, estreptococo y bacilo de la tuberculosis utilizando Mph-1-BTM.
- Figura 16: ilustra el constructo de un vector de expresión de pMph-1-insulina para producir una proteína de fusión entre Mph-1-BTM e insulina.

Figura 17A: tinción con azul de coomassie de la proteína de fusión purificada de pMph-1-insulina y pMph-1-insulina-PR.

Figura 17B: representa la transducción de proteína de fusión de insulina recombinante, pMph-1-insulina y pMph-1-insulina-PR en células T Jurkat.

5

Posteriormente se hacen descripciones más detalladas de acuerdo con ejemplos prácticos. Los ejemplos prácticos abajo descritos se dan únicamente a modo ilustrativo y esta invención no está limitada a los mismos. Además, la referencia técnica de esta invención se combina con la invención como

10

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de un vector de expresión que incluye Mph-1-BTM de péptido de transducción biomolecular

15

Una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido correspondiente a los aminoácidos desde el 858 de tirosina hasta el 868 de arginina del término-N del factor de transcripción de ratón de **Mph-1** (código de banco de genes: U63386) se combinó con una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína reporter de β -galactosidasa. Para ello, en primer lugar se sintetizó un cebador de SEQ. ID No.: 2 que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido correspondiente a los aminoácidos desde el 858 de tirosina hasta el 868 de arginina del término-N de **Mph-1** y el sitio *Bam*HI para clonación, y un cebador de SEQ. ID No.: 3 que contiene una secuencia de aminoácidos del terminal 3' de β -galactosidasa y la enzima de restricción del sitio *Bg*1II para clonación. Después se llevó a cabo una PCR utilizando el vector pIND/lacZ (Invitrogen corp.) como molde, con pfu turbo ADN polimerasa (Stratagene, nº cat. 600252-51). Después de digerir los productos de PCR con enzimas de restricción *Bam*HI y *Bg*1II, los resultados se purificaron con un Kit de purificación PCR (Quiaquick) (QIAGEN, nº cat. 28104). Los productos purificados se clonaron a pTrcHis B (Invitrogen, Cat. nº V360-20B), que se purificó con extracción en gel, en el sitio de reconocimiento *Bg*1II, con lo que se generó el vector de expresión recombinante, que se denominó p**Mph-1**- β -gal. La figura 1A ilustra el constructo del vector de expresión de p**Mph-1**- β -gal. El vector de

20

25

30

expresión de **pMph-1-β-gal** se trató con XbaI y HindIII y después se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%, seguida de tinción con bromuro de etidio (véase la figura 1B). En la figura 1B, la segunda columna representa el actual **pMph-1-β-gal** y la primera columna representa fragmentos de ADN de tamaño estándar.

Ejemplo 2: Preparación de un transformante de *E. coli* y expresión y aislamiento de la proteína de fusión del mismo

Un DH5α (ATCC nº 53863) se transformó utilizando el **pMph-1-β-gal** del Ejemplo 1 mediante transformación por choque térmico. Dos ml de los transformantes se transfirieron a 100 ml de medio LB y se preincubaron durante 12 horas a 37°C con agitación. Después, los transformantes preincubados se inocularon en 1.000 ml de medio LB (10 g de productos de digestión pancreática de caseína, 5 g de extracto de levadura, 10 g de cloruro de sodio) y se incubaron durante 4 horas a 37°C. Después de la incubación, se añadió 1 mM de IPTG (isopropil β-D-tiogalactosipiranosido, GibcoBRL nº cat. 15529-019) para inducir la expresión del operón lac, y después se incubó de nuevo durante 8 horas para provocar la expresión de la proteína de fusión. A continuación, la solución de cultivo celular se centrifugó a 6.000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C. Después de retirar el sobrenadante, la pella resultante se disolvió en 10 ml de una solución tampón 1 (50 mM de NaH₂PO₄, 300 mM de NaCl, 10 mM de imidazol, pH 8,0) incluyendo 1 mg/ml de lisozima (Sigma, nº cat. L-7651) y se dispuso sobre hielo durante 30 minutos. A continuación, la solución fue sometida de forma reiterada a ultrasonificación (Heat systems, ultrasonic processor XL, 300 w) durante 10 segundos y refrigeración durante 10 segundos, hasta que el tiempo de ultrasonificación acumulado llegó a 3 minutos. La solución eluida se centrifugó de nuevo a 12.000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C para eliminar los residuos de *E. coli* y aislar la solución eluida pura. Después se añadieron 2,5 ml de suspensión espesa de Ni²⁺-NTA agarosa al 50 % (Qiagen, nº cat. 30230) a la solución aislada y la mezcla se agitó a 200 r.p.m. durante 1 hora a 4°C con el fin de unir la proteína de fusión y la Ni²⁺-NTA agarosa. La mezcla obtenida se vertió en una columna (0,8 x 4 cm) para cromatografía (BioRad, nº cat. 731-1550). La mezcla se lavó dos veces con 4 ml de una solución tampón 2 (50 mM de NaH₂PO₄, 300 mM de NaCl, 20 mM de imidazol, pH 8,0). Después, la solución mixta se trató cuatro veces con 0,5 ml de una solución tampón 3 (50 mM de NaH₂PO₄, 300 mM de NaCl, 250 mM de imidazol, pH 8,0) para obtener fracciones de proteína de fusión. La proteína de fusión de **Mph-1-β-gal** aislada y

purificada se sometió a SDS-PAGE, seguida de tinción con azul de coomassie (véase la figura 2). En la figura 2, la primera columna corresponde al marcador proteínico utilizable como un patrón de peso molecular y la segunda columna representa la proteína de fusión de **Mph-1-β-gal**.

5 **Ejemplo 3: Transducción de la proteína de fusión a través de la membrana celular**

Se transfirieron a portaobjetos respectivos de una cámara Lab-tek II HUVEC (ATCC:CRL-1730) (2×10^5), HeLa (ATCC:CCL-2) (2×10^5) y 293 (ATCC:CRL-1573) (2×10^5), que se incubaron en FBS al 10% (suero bovino fetal) de DMEM. Se transfirieron a portaobjetos revestidos con poli-L-lisina células Jurkat (ATCC:CRL-10915) (2×10^5) incubadas en RPMI FBS al 10%. Cada uno de los portaobjetos se trató con 0,5 μ M de la **Mph-1-β-galactosidasa** purificada durante 30 minutos a 37°C en un incubador de CO₂ al 5%. Después se retiraron los sobrenadantes de los portaobjetos. Las mezclas de incubación se lavaron cuatro veces utilizando PBS helado y después se solidificaron con una solución de formaldehído al 2% durante 10 minutos. Después de retirar las soluciones solidificadas, las mezclas se lavaron de nuevo cuatro veces utilizando PBS helado. A continuación, las mezclas respectivas se trataron con 700 μ l de una solución de tinción de β-galactosidasa (Roche. Co.) durante 45 minutos a 37°C en un incubador de CO₂ al 5%. Después de la tinción, las mezclas se lavaron cuatro veces con PBS helado tras retirar los sobrenadantes. A continuación, las mezclas se montaron con un 70% de glicerol en los portaobjetos del microscopio. La figura 3A muestra las fotografías microscópicas. De acuerdo con los resultados obtenidos, la β-gal fusionada con **Mph-1** se transdujo a través de las membranas celulares de los cuatro tipos de células de forma muy eficiente, mientras que la β-gal sola no se transdujo en absoluto.

Por otro lado, la transducción de **Mph-1-β-gal** a través de la membrana celular se detectó tanto a 37°C como a 4°C con el fin de determinar si la transducción está mediada por un portador mediante endocitosis o no. Se lavaron dos veces con PBS helado células Jurkat, 3×10^6 , que se incubaron en un medio RPMI de FBS al 10% (suero bovino fetal), y se suspendieron en un medio RPMI de FBS al 10% (suero bovino fetal), y las fracciones de suspensión solubles se transfirieron después a cubetas de cultivo de 60 mm. La suspensión se trató con 1 mg/ml de Mph-1-β-galactosidasa durante 30 minutos tanto a 4°C como a 37°C en un incubador de CO₂ al 5%. Después de lavar dos veces la suspensión que incluía las células Jurkat con PBS helado, la suspensión se

disolvió en una solución tampón al 1% NP-40 (1% NP-40, 150 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl, 400 μ M de EDTA, 1 mM de Na_3VO_4 , 1 mM de NaF, 10 μ g de aprotinina, 10 μ g de leupeptina). A continuación, la solución se centrifugó durante 20 minutos a 4°C y se cuantificó utilizando el kit reactivo BCA protein assay (PIERCE). A continuación, 20 μ g de muestra se mezclaron con 66 μ l de tampón de ensayo de β -galactosidasa [3 μ l de solución 100 x Mg^{2+} , ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido)] y 0,1M de fosfato de sodio, y después se sometieron a reacción durante 30 minutos a 37°C y se añadió 1M Na_2CO_3 . La absorbancia de la solución (a 420 nm) se midió tres veces con un lector de microplacas (Molecular devices) y sus valores medios y desviaciones estándar se representaron en la figura 3B. Como resultado de ello, se observó que la proteína de fusión de **Mph-1**- β -gal se transducía de forma muy eficiente a través de la membrana celular tanto a 37°C como a 4°C, lo que aclaró que la transducción proteínica utilizando el Mph-1 de la presente invención no se producía meramente por endocitosis o fagocitosis mediada por receptor.

Ejemplo 4: Comparación de la eficiencia de transducción de Tat y Mph-1 a través de la membrana celular

Se diseñó un constructo pTat- β -gal ADN para comparar las eficiencias de transducción proteínica a través de la membrana celular entre el PTD convencional o Tat y el **Mph-1** de la presente invención. Para ello se incorporó una secuencia de ácido nucleico que codifica β -galactosidasa como indicador y una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido correspondiente a los aminoácidos 47 (tirosina) - 57 (arginina) del término-N de la proteína Tat de VIH. Específicamente, se sintetizó un cebador de SEQ. ID No.: 4 que contenía los aminoácidos 47 de tirosina a 57 de arginina del término-N de **Mph-1** y el sitio BamHI. Después se llevó a cabo una amplificación por PCR utilizando un vector pIND/lacZ (Invitrogen Inc.), que incluía genes totales de β -galactosidasa, como molde, y empleando un cebador de SEQ. ID No.: 3 que contenía el sitio Bgl II y la secuencia de ácido nucleico del extremo 3' de β -galactosidasa, con pfu turbo ADN polimerasa (Stratagene, n° cat. 600252-51). Los productos de PCR se cortaron con enzimas de restricción de BamHI y *Bgl*II, y después se purificaron utilizando el kit de purificación Quiaquick PCR (QIAGEN, n° cat. 28104). Los productos de PCR purificados se clonaron en pTrcHis B (Invitrogen, n° Cat. V360-20B), que se purificó con extracción en gel, en el sitio *Bgl*II, y se denominó pTat- β -gal. La figura 4A ilustra estos constructos. Después del aislamiento y la purificación de la proteína de fusión de Tat- β -gal de acuerdo con el Ejemplo 2,

se comparó la eficiencia de transducción de Tat- β -gal y **Mph-1**- β -gal en las células tanto a 0,1 μ g/ml como a 0,5 μ g/ml. Tal como se muestra en la figura 4B, el **Mph-1** se transdujo en las células con mayor eficiencia tanto a 0,1 μ g/ml como a 0,5 μ g/ml. En particular, la eficiencia de transducción del **Mph-1** era
5 considerablemente mayor cuando se introducían 0,1 μ g/ml de proteína de fusión.

Ejemplo 5: Transducción *in vivo* de una proteína deseada utilizando Mph-1

En este ejemplo se determinó la eficiencia de transducción de una
10 proteína deseada utilizando **Mph-1** a través de la membrana celular *in vivo*. Para determinar la eficiencia, 750 μ g de la proteína de fusión de **Mph-1**- β -gal purificada del Ejemplo 2 se mezclaron con PBS, y 500 μ l de la mezcla se administraron mediante inyección IP (intraperitoneal) a ratones C57BL/6 de 6 meses de edad una vez al día durante 3 días. En cambio, a los ratones control
15 sólo se les administró la misma cantidad de PBS mediante inyección IP. Cuatro horas después de la inyección final, los ratones fueron sacrificados y sus órganos se recogieron y lavaron con PBS (2 mM MgCl₂). Los órganos tratados con PBS se dispusieron sobre un 5% de formalina helada. Después, los órganos se lavaron cinco veces con PBS y cada uno de los órganos se transfirió a una
20 solución de tinción de β -gal (Roche. Co.). Doce horas después se detectó el cambio de color. Tal como se muestra en la figura 5A, se observó que la proteína β -gal se transdujo de forma eficiente en el riñón, el cerebro, el hígado, los pulmones y el corazón, lo que indica que la proteína diana había sido transferida de forma eficiente en órganos *in vivo* utilizando **Mph-1**-BTM.

25 Además se examinó si la β -gal era traducida mediante el **Mph-1** BTM en las células que constituyen los órganos diana o si era transducida mediante el **Mph-1** BTM únicamente en la superficie de los órganos. Para realizar este examen, en primer lugar se combinó una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido correspondiente a los aminoácidos 858 de tirosina a 868 de
30 arginina del término-N del factor de transcripción de ratón de **Mph-1** (código de banco de genes: U63386) y una secuencia de ácido nucleico que codifica un indicador de eGFP (proteína fluorescente verde aumentada). Para la combinación, se sintetizó un cebador de SEQ. ID No.: 2 que contiene los aminoácidos desde el 858 de tirosina hasta el aminoácido 868 de arginina del
35 término-N del factor de transcripción de ratón de **Mph-1** y el sitio *Bam*HI, y un cebador de SEQ. ID No.: 5 que contiene el sitio *Bgl* II para clonación y una

secuencia de ácido nucleico del terminal 3' de eGFP. Después se llevó a cabo una amplificación por PCR utilizando el vector pEGFP-N1 (Invitrogen Inc.) que comprende genes de eGFP totales, como molde, con pfu turbo ADN polimerasa (Stratagene, n° cat. 600252-51).

5 Los productos de PCR se trataron con enzimas de restricción de BamHI y BglII y se purificaron utilizando el kit de purificación Quiaquick PCR (QIAGEN, n° cat. 28104). A continuación, los productos de PCR purificados se clonaron en pTrcHis B (Invitrogen, n° Cat. V360-20B), que se extrajo con la extracción en gel en el sitio Bgl II. El vector de expresión recombinante obtenido se denominó
10 **pMph-1-eGFP**. Un **Mph-1-eGFP** expresado en DH5a se aisló y purificó de acuerdo con el Ejemplo 2 y después se administró a los ratones mediante inyección intraperitoneal. Cuatro horas después de la inyección se les extirpó quirúrgicamente el bazo y se trituró. Después se aislaron esplenocitos del bazo triturado. A continuación se llevó a cabo un análisis FACS para controlar el
15 eGFP que había sido transducido en las células (véase la figura 5B). Tal como se muestra en la figura 5B, se observó que el eGFP que había sido transducido en bazo mediante **Mph-1-BTM** también había sido transducido de forma eficiente en los esplenocitos que constituyen el bazo.

También se examinó si la proteína deseada era transducida mediante
20 **Mph-1-BTM** en órganos *in vivo* a través de la sangre. Quinientos µl de una mezcla de 750 µg de la proteína de fusión de **Mph-1-β-gal** aislada y purificada y PBS se administraron a ratones C57BL/6 de 6 meses de edad una vez al día durante 3 días vía IP (intraperitoneal), IV (intravenosa), SC (subcutánea) o nasal. En cambio, a los ratones control sólo se les administró la misma cantidad
25 de PBS mediante inyección IP. Después de extraer sangre a los ratones a los que se les habían inyectado las proteínas de fusión, se aislaron células T utilizando MACS y mAb anti-CD3, y después se determinó la actividad de β-galactosidasa tal como se describe en el Ejemplo 3. La figura 5 muestra los resultados. De acuerdo con éstos, las proteínas de fusión se administraron de
30 forma eficiente mediante el **Mph-1-BTM** a través de numerosas vías de administración, como las vías IP, IV, SC y nasal, a las células T de la sangre.

Ejemplo 6: Transducción específica celular de la proteína de fusión entre Mph-1 y una proteína deseada

Para introducir selectivamente la proteína de **Mph-1-β-gal** deseada de
35 acuerdo con el Ejemplo 2 en una célula específica, en este ejemplo se utilizó un

ligando o un receptor que existe específicamente en la célula, el tejido o el órgano en el que se transduce la proteína. Por ejemplo, para la transducción de la proteína deseada en células T se diseñó un vector de expresión de **pMph-1- β -gal-B7.1** mediante la inserción de una secuencia de aminoácidos del sitio de corte de MMP (metaloproteasa de matriz), que estaba presente sobre la matriz extracelular y estaba unida a la membrana celular, en el **Mph-1- β -gal** en la región 3', y a continuación mediante la clonación de B7.1 de ligando de receptor CD28 específico de células T, cerca de la región 3'. Además se generó el vector de expresión de **pMph-1- β -gal-B7.1** mediante una amplificación PCR utilizando una mezcla de ADNc de células T primarias humanas producidas en nuestro laboratorio, como molde, y empleando un cebador de SEQ. ID No.: 6 que contiene un sitio BamH I y un término-N de B7.1, y un cebador de SEQ. ID No.: 7 que contiene el sitio Bgl III y un término-C de B7.1, y la ejecución de una clonación molecular de acuerdo con el Ejemplo 1. La figura 6A representa el constructo del vector de expresión de **pMph-1- β -gal-B7.1**. Después de transformar DH5a con el vector de expresión de **pMph-1- β -gal-B7.1** del Ejemplo 2, la proteína de fusión de **Mph-1- β -gal-B7.1** se aisló del cultivo celular y se purificó. Cuatro horas después de inyectar la proteína de fusión a un ratón vía IP, se recogieron células T de la sangre para detectar la actividad de β -gal. Tal como se muestra en la figura 6B, en las células T se observó una actividad de β -gal relativamente alta, mientras que en las células B se observó poca actividad de β -gal. Estos resultados confirmaron que la proteína de fusión de **Mph-1- β -gal** se transducía específicamente en células T después de la unión entre B7.1 de la proteína de fusión y las células T CD28 o CTLA-4 seguida del corte de la proteína de fusión mediante la MMP existente en la superficie de las células T.

Ejemplo 7: Transducción intracelular de ADN (CD8- ξ) utilizando Mph-1-BTM

(PASO 1): Preparación de un vector de expresión que incluye genes de fusión de Mph-1 y Gal4

El vector **pMph-1- β -gal** del Ejemplo 1 se trató con enzimas de restricción, *XbaI* y *BglIII*, para eliminar el gen de β -galactosidasa del mismo. Después se desarrolló el plásmido **pMph-1-Gal4** mediante una amplificación PCR convencional y una clonación molecular, tal como se describe en el Ejemplo 1, utilizando un cebador de SEQ. ID No.: 8 que tiene una secuencia N-terminal de proteína de unión de ADN GAL4 y un sitio de enzima de restricción de *XbaI*, y un cebador de SEQ. ID No.: 9 que tiene una secuencia N-terminal de proteína de

unión de ADN GAL4 y un sitio de enzima de restricción Bgl II. La figura 7 ilustra el constructo del vector de expresión de **pMph-1-Gal4**.

(PASO 2): *Preparación de un vector de expresión de pCD8-z-5XGBS que tiene una secuencia de ADN a la que se une específicamente la proteína de unión de ADN Gal4*

Para llevar a cabo la unión de **Mph-1-Gal4** del Ejemplo 1 con mayor eficiencia, se diseñó un pCD8-z-5XGBS mediante la clonación de 5 (cinco) secuencias GBS sucesivas en el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Stul de pcDNA3-CD8-z, que se preparó mediante la inserción de CD8- ξ en el vector de expresión pcDNA3 (Invitrogen Inc.) en sitios de reconocimiento de la enzima de restricción para *XbaI* y *BamHI*. Específicamente, se sintetizó una secuencia de ácido nucleico correspondiente a GBS utilizando un cebador y se hibridó, y después se clonó en pCD8- ξ en el sitio de reconocimiento Stul del término-3'. La figura 8 ilustra la estructura del vector de expresión de pCD8- ξ -5XGBS. La secuencia de ácido nucleico de GBS se designó como SEQ. ID No.: 10.

(PASO 3): *Confirmación de la transducción de CD8- ξ ADN utilizando **Mph-1***

Gal4 de proteínas de fusión de **Mph-1-Gal4** se unieron respectivamente a cada uno de los cinco GBS de pCD8- ξ -5XGBS. La proteína de fusión de **Mph-1-Gal4** expresada y purificada en el Ejemplo 2 se unió al ADN de pCD8- ξ -5XGBS preparado en el Paso 2 utilizando el vector de expresión de **pMph-1-Gal4** producido en el Paso 1 a temperatura ambiente. Después de mezclar el complejo de fusión con PBS, la mezcla se introdujo en 10^7 células T primarias y después se incubó durante 48 horas a 37°C para inducir la sobreexpresión de las proteínas de fusión de CD8- ξ provocada por los constructos de ADN suministrados a las células. Para determinar la sobreexpresión de las proteínas de fusión de CD8- ξ en la superficie celular, se llevó a cabo un análisis FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter – distribuidor celular activado por fluorescencia) utilizando OKT8 (ATCC nº CRL-8014) de un anticuerpo monoclonal de CD8 (protocolo actual para inmunología). La figura 9 muestra los resultados. Como se muestra en la figura 9A, el CD8- ξ fusionado con el péptido de transducción biomolecular **Mph-1** se transdujo en las células a través de la membrana celular. Como controles negativos se analizaron mediante FACS las expresiones de moléculas quiméricas en células T, que incluyen proteínas de fusión de **Mph-1-Gal4** sin pCD8- ξ -5XGBS o incluyendo pCD8- ξ -5XGBS solo.

Como resultado, el constructo de ADN deseado a transducir en la célula se unió a las secuencias de unión de proteínas de unión de ADN y, de este modo, la proteína de unión de ADN fusionada con **Mph-1** transfirió eficientemente el constructo de ADN deseado a través de la membrana celular para la expresión del constructo de ADN.

Además, en este ejemplo se examinó la transducción de ADN utilizando **Mph-1** BTM *in vivo*. Para ello se administró a un ratón mediante inyección IP un complejo entre la proteína de fusión de **Mph-1**-Gal4, que se fusionó a temperatura ambiente, y pCD8- ξ -5XGBS, y 48 horas después de la inyección se recogieron células T de la sangre utilizando mAb anti-CD2 y MACS tal como se describe en el Ejemplo 5. Después se aislaron esplenocitos del bazo y se determinó mediante FACS el nivel de expresión de las proteínas quiméricas de CD8- ξ sobre la superficie de los esplenocitos. Los resultados se muestran en la figura 9B. De acuerdo con éstos, el vector de expresión de pCD8- ξ -5XGBS, que se transdujo *in vivo* en la célula utilizando **Mph-1**-BTM y Gal4, no sólo se transdujo en las células T, sino también en los esplenocitos del bazo.

Ejemplo 8: Transducción específica de células T y expresión de ADN de pCD8- ξ

(PASO 1): *Preparación de un vector de expresión que incluye genes de **Mph-1**, Gal4 y B7.1*

En este ejemplo se examinó la transducción específica de células T de ADN de pCD8- ξ utilizando **Mph-1**. El sitio de corte de MMP específico de células T se clonó en p**Mph-1**-Gal4 del Ejemplo 7 en la región 3', de acuerdo con el Ejemplo 6, y después se insertó el ectodominio de B7.1 mediante amplificación por PCR convencional y clonación molecular utilizando una mezcla de ADNc de células T, preparada en nuestro laboratorio, como molde, y utilizando cebadores (SEQ. ID No.: 6 y 7), tal como se describe en el Ejemplo 1. De este modo se generó el constructo de ADN p**Mph-1**-Gal4-B7.1 (véase la figura 10A).

(PASO 2): *Preparación de un vector de expresión que comprende un promotor de Lck específico de células Tm pLCD8- ξ y 5 (cinco) GBS*

El promotor CMV diseñado en el paso 2 del Ejemplo 7 se sustituyó por un promotor de lck específico de células T en el sitio de reconocimiento HindIII empleando un método de clonación molecular convencional. La figura 10 muestra el constructo del vector de expresión de pLCD8- ξ -5XGBS.

(PASO 3): *Transducción específica de células T de ADN de pCD8- ξ -5XGBS utilizando **Mph-1***

En este ejemplo, el pCD8- ξ -5XGBS diseñado en el Paso 2 del Ejemplo 7 se transfirió específicamente *in vivo* a una célula T. Se preparó a temperatura ambiente un complejo de la proteína de fusión de **Mph-1**-Gal4-B7.1, purificada y expresada tal como se describe en el Ejemplo 7 y el vector de expresión de pCD8- ξ -5XGBS. Cuarenta y ocho horas después de administrar la mezcla del complejo y PBS vía IP a un ratón, se recogieron células T y células B de sangre utilizando mAb anti-CD2 y mAb anti-B220, respectivamente, con MACS del ratón. Después se examinó el nivel de expresión de la molécula quimérica superficial de CD8- ξ con FACS utilizando mAb anti-CD8 de OKT (véase la figura 10C). Como resultado, el vector de expresión de pCDS- ξ -5XGBS se situó en primer lugar alrededor de células T a través de la unión entre la porción extracelular de la proteína de fusión de **Mph-1**-Gal4-B7.1 y CD28 o CTLA-4, que estaban presentes en la superficie de la célula T, y después se cortó a través de MMP en la superficie de células T. De este modo, el complejo de **Mph-1**-Gal4 y pCD8- ξ -5XGBS se transdujo de forma eficiente en células T y se expresó en las mismas, mientras que las moléculas quiméricas CD8-z no se expresaron en células B, ya que no había ningún vector de expresión transferido a células B.

20 (PASO 4): *Expresión específica de células T de ADN de pLCD8- ξ -5XGBS utilizando **Mph-1***

Para que el vector de expresión del Paso 2 de este ejemplo fuera expresado por vías específicas de células T utilizando la proteína de fusión de **Mph-1**-Gal4 del Paso 2 del Ejemplo 7, en primer lugar un complejo de **Mph-1**-Gal4 y pLCD8- ξ -5XGBS, que había sido producido a temperatura ambiente tal como se describe más arriba en el Paso 3, se transfirió a células *in vivo*. Cuarenta y ocho horas después de administrar la mezcla del complejo y PBS vía IP a un ratón, se recogieron células T y células B de sangre utilizando mAb anti-CD2 y mAb anti-B220, respectivamente, con MACS del ratón. Después se examinó el nivel de expresión de la molécula quimérica superficial de CD8- ξ con FACS utilizando mAb anti-CD8 de OKT (véase la figura 10C). Como resultado se observó la expresión específica de células T del vector de expresión de pLCD8- ξ -5XGBS.

35 **Ejemplo 9: Transducción intracelular del complejo de fusión entre Mph-1 y un inmunosupresor de TMC específico de células T**

Se diseñó una proteína de fusión de **Mph-1** y una porción extracelular de B7.1 para transducir diversos tipos de compuestos químicos con actividades biológicas *in vitro* e *in vivo*. Después se diseñó un vector de expresión de **pMph-1-B7.1** utilizando una biblioteca de ADNc de células T de ratón, producida en nuestro laboratorio, como molde, y utilizando un cebador de SEQ. ID No.: 11 que comprende el sitio de enzima de restricción de BamHI, **Mph-1** BTM y una secuencia de ácido nucleico N-terminal de B7, y un cebador de SEQ. ID No.: 12 que comprende el sitio de enzima de restricción Bgl II y una secuencia de ácido nucleico C-terminal de B7. Entre el **Mph-1** y el B7.1 se introdujo un sitio de corte MMP específico de células T. La proteína de fusión **Mph-1-B7.1**, que se expresó y purificó a partir de DH5a, se unió a TMC (tautomycinetina) utilizando un enlace químico sensible al pH tal como se ilustra en la figura 11. Se trataron células T Jurkat con 0,1 µg/ml del complejo TCM-**Mph-1-B7.1**. Cinco horas después del tratamiento, la apoptosis de células T Jurkat inducida por TCM se analizó con FACS utilizando tinción con PI [I. Schmid y col., Cytometry 13:204-208 (1992)] (véase la figura 11B). Como resultado se observó que los compuestos de TMC transferidos a las células T Jurkat utilizando las proteínas de fusión **Mph-1-B7** provocaron la apoptosis de forma eficiente.

También se examinaron y analizaron los efectos inmunosupresores de TCM-**Mph-1-2-B7.1** *in vivo*. El efecto inmunosupresor *in vivo* de TCM-**Mph-1-2-B7.1** se determinó utilizando el modelo animal de rechazo de órganos del rechazo de aloinjerto heterocardiaco de rata (Jar-Hyuck Sim y col., PNAS vol. 99, nº 16, 10617-10622, 2002). La Tabla 1 muestra los resultados.

Tabla 1

Fármacos	Concentración (mg/kg)	Administración	Días de vida	Número de ratas
Cremophor	5	IP	9	4
	5	IP	10	3
CsA/ Cremophor	5	IP	> 100	2
Mph-1-TMC/PBS	0,05	IP	> 160	12
Mph-1-TMC/PBS	0,03	Cutánea	> 160	8

Como muestran los resultados, los órganos transplantados de los modelos animales de rechazo de órganos a los que se les había administrado el complejo TMC-**Mph-1-B7.1** mediante inyección IP (0,05 µg/ml) o vía subcutánea (0,03 µg/ml) funcionaron durante 160 días o más, mientras que los órganos

transplantados de los modelos animales de rechazo de órganos a los que se les había administrado el inmunosupresor de CsA (ciclosporina A) convencional mediante inyección IP funcionaron durante 100 días o más. Por otra parte, los órganos transplantados de los modelos animales de rechazo de órganos a los que se les había administrado cremophor mediante inyección IP funcionaron únicamente durante 9 ó 10 días.

Ejemplo 10: Efectos inmunosupresores *in vivo* de los fármacos proteínicos Mph-1-zA1A2 y Mph-1-CTLA-4

Tal como se ha confirmado en el ejemplo arriba descrito, se demostró que el **Mph-1**-BTM puede transferir de forma eficiente numerosos materiales que controlan *in vivo* diversas respuestas fisiológicas, como proteínas, ADN y/o ARN y compuestos químicos, en numerosos órganos o células que constituyen los órganos, mediante la unión de los materiales de forma covalente o no covalente. Por consiguiente, en este ejemplo se proporcionó un nuevo tipo de fármaco proteínico que podría regular la respuesta inmunológica *in vivo* mediante la introducción de una proteína de tipo salvaje o mutante que regulaba la transducción de señales intracelular, utilizando el **Mph-1**-BTM. Como proteína deseada que inhibe la respuesta inmunológica provocada por células T, en este ejemplo se seleccionó un dominio citoplásmico de cadena z de una cadena de transducción de señales de complejo TcR, que reconoce *in vivo* tanto una porción de péptido antigénico como MHC, con lo que transfiere la señal de activación a las células. Nosotros, los inventores, verificamos en un estudio preliminar que, en el caso de la sobreexpresión del tipo zA1A2 preparado mediante la sustitución de tirosina con fenilalanina en el primer ITAM de dominio citoplásmico de la cadena z de TCR, las señales de activación de las células T estaban bloqueadas de forma significativa (Wook-Jin Chae y col., JBC 2003). En base a estos resultados se preparó un vector de expresión mediante la fusión de Mph-1-BTM y el tipo zA1A2 de la cadena z de TcR. La figura 12 (a) muestra este constructo. Para producir este vector de expresión se prepararon un cebador 5' de SEQ. ID No.: 13 que comprende una secuencia de ácido nucleico de enzima de restricción de Xba I, una secuencia de ácido nucleico de **Mph-1**-BTM y una secuencia de ácido nucleico N-terminal de dominio citoplásmico, y un cebador 3' de SEQ. ID No.: 13 que comprende una secuencia de ácido nucleico del sitio Hind III y una secuencia de ácido nucleico C-terminal de cadena z. Después se llevó a cabo una amplificación por PCR utilizando el vector de expresión pcDNA3-zA1A2 sintetizado en nuestro laboratorio (Wook-Jin

Chae y col., JBC 2003), como molde, y empleando los cebadores arriba mencionados. A continuación, los productos PCR se clonaron en un vector de expresión de pGELysRS(2) tanto en el sitio Xba I como en el sitio Hind III, habiéndose preparado el vector pGELysRS(2) mediante la eliminación de la
5 enzima de restricción de Xba I en la región 5' de ATG-LysRS de un vector de expresión, pGELysRS que expresa efectivamente una proteína en un tipo soluble. De este modo se desarrolló el vector de expresión p**Mph-1-2-zA1A2**.

Para preparar otra proteína deseada, que regula la respuesta inmunológica *in vivo*, utilizando **Mph-1-BTM**, se empleó un dominio citoplásmico
10 de proteína CTLA-4, que es un regulador negativo durante el proceso de activación de células T, como componente de fusión, junto al **Mph-1-BTM**. La CTLA-4 es una proteína de membrana celular hallada en la superficie de células T activadas y se sabe que inhibe la activación de las células T mediante la unión de alguna de las proteínas de la familia B7 sobre la superficie de CPA (célula
15 presentadora de antígeno). Para la preparación de una proteína de fusión de **Mph-1-BTM** y un dominio citoplásmico de CTLA-4, se diseñó un vector de expresión de p**Mph-1-CTLA-4**, cuyo constructo se muestra en la figura 12 (b). Para producir este vector de expresión se preparó un cebador 5' de SEQ. ID No.: 15 que comprende una secuencia de ácido nucleico de enzima de
20 restricción de Xba I, una secuencia de ácido nucleico de **Mph-1-BTM** y una secuencia de ácido nucleico N-terminal de proteína CTLA-4, y un cebador 3' de SEQ. ID No.: 13 que comprende una secuencia de ácido nucleico de Hind III y una secuencia de ácido nucleico N-terminal de CTLA-4. Después se llevó a cabo una amplificación por PCR utilizando una mezcla de ADNc de células T
25 primarias sintetizada en nuestro laboratorio (Wook-Jin Chae y col., JBC 2003), como molde, y empleando los cebadores arriba mencionados. A continuación, los productos PCR se clonaron en un vector de expresión de pGELysRS(2) tanto en el sitio Xba I como en el sitio Hind III, habiéndose preparado el vector pGELysRS(2) mediante la eliminación de la enzima de restricción de Xba I en la
30 región 5' de ATG-LysRS de un vector de expresión, pGELysRS que expresa efectivamente una proteína en un tipo soluble. De este modo se desarrolló el vector de expresión p**Mph-1-CTLA-4**.

Se transformó *E. coli* de BL21 (Invitrogen, n° cat.: c7010-03) mediante transformación por choque térmico utilizando los vectores de expresión p**Mph-1-
35 zA1A2** y p**Mph-1-CTLA-4**. Después de aislar y purificar las proteínas de fusión expresadas, los productos obtenidos se sometieron a SDS-PAGE, seguida de tinción con azul de coomassie. Las figuras 13 (a) y (b) muestran los resultados.

Con la proteína de fusión **Mph-1-zA1A2** y la proteína de fusión **Mph-1-CTLA-4** aisladas y purificadas se examinaron y analizaron los efectos inmunosupresores *in vivo* utilizando el modelo animal de rechazo de órganos del rechazo de aloinjerto heterocardiaco de rata descrito en el Ejemplo 9 (Jar-Hyuck Sim y col., PNAS vol. 9, nº 16, 10617-10622, 2002). La Tabla 2 muestra los resultados.

Tabla 2

Fármacos	Concentración (mg/kg)	Administración	Días de vida	Número de ratas
Cremophor	5	IP	9	4
	5	IP	10	3
Ciclosporina A / Cremophor	5	IP	> 100	2
Mph-1-zA1A2/PBS	0,05	IP	> 160	8
Mph-1-CTLA-4/PBS	0,05	IP	> 160	12

Como muestran los resultados, los órganos transplantados de los modelos animales de rechazo de órganos a los que se les había administrado respectivamente **Mph-1-zA1A2** y **Mph-1-CTLA-4** mediante inyección IP (0,05 µg/ml) o por vía subcutánea (0,04 µg/ml) funcionaron durante 160 días o más, mientras que los órganos transplantados de los modelos animales de rechazo de órganos a los que se les había administrado el inmunosupresor de CsA (ciclosporina A) convencional mediante inyección IP funcionaron durante 100 días o más. Por otra parte, los órganos transplantados de los modelos animales de rechazo de órganos a los que se les había administrado cremophor mediante inyección IP funcionaron únicamente durante 9 ó 10 días. Estos resultados sugerían que tanto el tipo zA1A2 de cadena z de TCR como la CTLA-4 habían sido transducidas de forma eficiente en células T mediante **Mph-1-BTM** e inhibían la activación de células T, presentando efectos inmunosupresores.

Ejemplo 11: Transducción de macromoléculas en células callus vegetales utilizando Mph-1 BTM

En este ejemplo, las proteínas deseadas se transdujeron en células no animales utilizando **Mph-1-BTM**. En pocas palabras, a unas células de callus vegetal cultivadas se añadieron 10 µM de proteínas de fusión de **Mph-1-β-gal** y 1 hora después las células se examinaron bajo un microscopio confocal para analizar el nivel de transducción de β-galactosidasa en las células. La figura 14 muestra los resultados. Específicamente, se cultivaron hojas de tabaco

recolectadas en un medio inductor de callus que incluía auxina y citoquina, y el callus vegetal producido se cultivó en un medio MS libre de agar (cultivo de suspensión). Como resultado, 15 minutos después de la introducción de una proteína de fusión utilizando **Mph-1**-BTM se observó que la β -galactosidasa era transducida de forma eficiente no sólo en las células del callus, sino también en el núcleo de las células.

Ejemplo 12: Transducción de macromoléculas en diversos tipos de bacterias mediante Mph-1-BTM

En este ejemplo, las proteínas deseadas se transdujeron en diversos tipos de bacterias. Un μ M de proteína de fusión **Mph-1**- β -gal se introdujo en diversas bacterias, como *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus aureus* y *tubercle bacillus*. Una hora después de la introducción se determinaron las actividades de la β -galactosidasa transducida. La figura 15 muestra los resultados. De acuerdo con éstos, se confirmó que las macromoléculas eran transducidas de forma eficiente en las células bacterianas con **Mph-1**-BTM.

Ejemplo 13: Producción de fármacos proteínicos que presentan estructura de plegado y funciones naturales utilizando Mph-1-BTM

Una proteína de fusión de **Mph-1**-BTM y una proteína reguladora funcional biológicamente activa, expresada y purificada a partir de bacterias, se reformó para que presentara la estructura de plegado y las funciones naturales. Específicamente, la proteína de fusión aislada y purificada a partir de bacterias se transfirió de nuevo a células de CHO (ovario de hámster chino) y después se aisló y purificó la proteína de fusión, que tenía la estructura de plegado completa y las funciones que presenta en su estado natural. Se examinaron las capacidades de regulación de la actividad biológica de los 2 (dos) tipos de proteínas de fusión purificadas. Para este examen se diseñó un vector de expresión **pMph-1**-insulina con el fin de preparar la proteína de fusión entre el **Mph-1**-BTM e insulina humana. Para producir este vector de expresión se preparó un cebador 5' de SEQ. ID No.: 17 que comprende una secuencia de ácido nucleico de enzima de restricción de Xba I, una secuencia de ácido nucleico de **Mph-1**-BTM y una secuencia de ácido nucleico N-terminal de insulina humana, y un cebador 3' de SEQ. ID No.: 18 que comprende una secuencia de ácido nucleico de Hind III y una secuencia de ácido nucleico C-terminal de insulina humana. Después se llevó a cabo una amplificación por

PCR utilizando células beta de páncreas humano preparadas en nuestro laboratorio, como molde, y empleando los cebadores arriba mencionados. A continuación, los productos de PCR se clonaron en un vector de expresión de pGELysRS(2) tanto en el sitio Xba I como en el sitio Hind III, habiéndose
5 generado el vector pGELysRS(2) mediante la eliminación de la enzima de restricción de Xba I en la región 5' de ATG-LysRS de un vector de expresión, pGELysRS que expresa efectivamente una proteína en un tipo soluble. De este modo se obtuvo el vector de expresión de **pMph-1-insulina**, cuyo constructo se muestra en la figura 16. Se transformó *E. coli* de BL21 (Invitrogen, n° cat.:
10 c7010-03) mediante transformación por choque térmico utilizando los vectores de expresión de **pMph-1-insulina** preparados. Después, la proteína de fusión de **pMph-1-insulina** expresada se recogió y purificó de acuerdo con el Ejemplo 2. Un µg/ml de la proteína de fusión de **Mph-1-insulina** purificada se transfirió de nuevo a las células de CHO y después se aisló y purificó la proteína de fusión
15 de **Mph-1-insulina**, de la que se consideraba que tenía una estructura y unas funciones naturales, y la proteína de fusión obtenida se denominó **Mph-1-insulina-PR**. Estos 2 (dos) tipos de proteínas de fusión de **Mph-1-insulina** y **Mph-1-insulina-PR** se sometieron a SDS-PAGE y tinción con azul de coomassie. La figura 17A muestra los resultados. Para confirmar si estas 2 proteínas de fusión
20 eran transferidas efectivamente a células T Jurkat con **Mph-1** BTM, se trataron células T Jurkat respectivamente con estas 2 proteínas de fusión e insulina recombinante no fusionada con **Mph-1-BTM**, tal como se describe en el Ejemplo 3. Después del tratamiento se determinó el nivel de transducción de insulina en las células utilizando mAb para la insulina y se comparó. La figura 17B muestra
25 los resultados. De acuerdo con éstos, tanto la **Mph-1-insulina** como la **Mph-1-insulina-PR** eran transducidas de forma eficiente en las células T Jurkat, mientras que casi ninguna de las insulinas recombinantes que no tenían **Mph-1** BTM era transducida en las células T.

30 **Ejemplo 14: Disminución del nivel de glucosa en sangre utilizando una proteína de fusión de Mph-1-insulina**

La disminución del nivel de glucosa en sangre utilizando **Mph-1-insulina** y **Mph-1-insulina-PR** del Ejemplo 13 se examinó con ratones diabéticos por inducción con estreptozotocina. Después de 3 (tres) días de abstinencia, a STYZ (Sigma Chemical Co, St Louis, EE. UU.) (60 mg/kg) se les administraron
35 las proteínas de fusión mediante inyección IP. Los ratones diabéticos unsulinodependientes se definieron como ratones que tenían un nivel de

glucosa en sangre de 20 mmol/l o más junto con otros síndromes de la diabetes, como poliurea, etc. Todos los estudios *in vivo* se realizaron 2 semanas después de la inducción de la diabetes. Los ratones recibieron la administración mediante inyección IP (1-10 mM) de insulina recombinante sola, Mph-1-insulina y **Mph-1-insulina-PR** del Ejemplo 13, respectivamente, y después se controlaron los niveles de glucosa en sangre de los ratones. Para analizar el nivel de glucosa en sangre se extrajeron aproximadamente 0,2 ml de sangre de cada ratón después de anestesiarlos y a continuación la sangre se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 3 minutos. Después se añadieron aproximadamente 15 ml de suero a 1,5 ml de reactivo del kit de glucosa (BiosystemSA, Barcelona, España) y la mezcla se incubó a 37°C durante 10 minutos en un baño de agua. El nivel de glucosa en sangre se determinó con un analizador de glucosa en sangre (Quik-Lab, Ames, Miles Inc. Elkart, Indiana, EE. UU.). La Tabla 3 muestra los resultados.

Tabla 3

Fármaco	Antes de la administración	Después de la administración
PBS	5270	5390
Insulina recombinante	5600	2320
Mph-1-insulina	6450	1570
Mph-1-insulina-PR	6630	350

15

Como muestra la Tabla 3, la insulina recombinante redujo el nivel de glucosa en sangre en un 50%, y la **Mph-1-insulina** redujo dicho nivel en un 70%. Por otro lado, la **Mph-1-insulina-PR**, que había sido obtenida en células de CHO y se consideraba que tenía la estructura de plegado y las funciones de la proteína natural, redujo el nivel en un 90% o más. De acuerdo con los resultados, una vez que la proteína de fusión ha sido transferida a células animales con **Mph-1** BTM, se considera que es sometida a una maquinaria de plegado de proteínas dentro en las células, por lo que la proteína presenta su estructura de plegado y sus funciones naturales. En pocas palabras, después de producir numerosas proteínas deseadas a partir de bacterias utilizando **Mph-1-BTM** masivamente, las proteínas recombinantes obtenidas se transfirieron de nuevo con el **Mph-1-BTM** a las células que generan naturalmente *in vivo* el mismo tipo de proteínas que las proteínas recombinantes, y después se purificaron las proteínas deseadas del cultivo celular. Se espera que las proteínas deseadas finalmente purificadas tengan significativamente una excelente eficacia al ser usadas como agentes de tratamiento básico y clínico.

30

APLICACIÓN INDUSTRIAL

Tal como se describe anteriormente, el **Mph-1**-BTM de la presente invención, que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID No.: 1, suministra *in vivo* e *in vitro* moléculas reguladoras funcionales biológicamente
5 activas al citosol, a los orgánulos o al núcleo de células procariotas y eucariotas, a través de numerosas vías, por ejemplo las vías intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, oral, nasal, subcutánea, intradérmica, mucosa y por inhalación. Por consiguiente, esta invención se puede utilizar para proporcionar nuevos métodos para tratar enfermedades utilizando proteínas, genes y compuestos
10 químicos. Además, esta invención se puede utilizar para proporcionar un nuevo sistema de suministro de fármacos y proteínas que presentan una estructura y unas funciones naturales.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> LEE, SANG KYOU

<120> MOTIVO DE TRANSDUCCIÓN BIOMOLECULAR MPH-1-BTM Y
5 UTILIZACIÓN DEL MISMO

<130> PN-22868-PCT

<150> KR 10-2002-0003183

10 <151> 19-01-2002

<160> 18

<170> Kopatent In 1.71

15

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Motivo de transducción biomolecular

<400> 1

Tyr Ala Arg Val Arg Arg Arg Gly Pro Arg Arg

25 1 5 10

<210> 2

<211> 72

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> Cebador 5' para Mph-1

<220>

35 <221> misc_feature

<222> (4)..(9)

<223> Sitio BamHI

<220>

<221>misc_feature

5 <222> (43)..(48)

<223> Sitio XbaI

<400>2

cgcggtatcct atgcacgtgt tcggaggcgt ggaccccgcc gctctagaga tcccgtcgtt 60

ttacaacgtg ac 72

10

<210>3

<211>26

<212>ADN

<213>Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Cebador 3' para beta-gal

<220>

20 <221>misc_feature

<222> (3)..(8)

<223> Sitio BglII

<400>3

25 gaagatcttt attttgaca ccagac 26

<210>4

<211>75

<212>ADN

30 <213>Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador 5' para tat

35 <220>

<221>misc_feature

<222>(4)..(9)

<223> Sitio BamHI

<400>4

cgcggtatcct atggaaggaa gaagaagcgg agacaaagac gacgatctag agatcccgtc 60

5 gtittacaac gtgac 75

<210>5

<211>18

<212>ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador 3' para eGFP

15 <220>

<221>misc_feature

<222>(3)..(8)

<223> Sitio BglII

20 <400>5

gaagatcttt tacttgta 18

<210>6

<211>18

25 <212>ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador 5' para B7.1

30

<220>

<221>misc_feature

<222>(4)..(9)

<223> Sitio BamHI

35

<400>6

cgcggatccg gccacaca 18

<210>7
 <211>18
 5 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador 3' para B7.1
 10

<220>
 <221>misc_feature
 <222>(3)..(8)
 <223>Sitio BglII
 15

<400>7
 gaagatcttt acagggcg 18

<210>8
 20 <211>21
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

<220>
 25 <223> Cebador 5' para Gal4

<220>
 <221>misc_feature
 <222>(4)..(9)
 30 <223>Sitio XbaI

<400>8
 cgctctagaa agctactgtc t 21

35 <210>9
 <211>21
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador 3' para Gal4

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (4)..(9)

<223> Sitio HindIII

<400> 9

10 cccaagcttc ggcgatacag t 21

<210> 10

<211> 119

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de unión de Gal4

20 <400> 10

ctcaggagaca gtactccgct cggaggacag tactccgac cgtcgactct agagggtata 60

taatgcgcca gctcgaattc atcagcttgg cgagattttc aggagctaag gaagctaaa 119

<210> 11

<211> 51

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> N terminal de BamHI-Mph-1-B7

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(9)

<223> Sitio BamHI

35

<400> 11

cgcggtatcct atgcacgtgt tcggaggcgt ggaccccgcc gcggccacac a 51

<210> 12
 <211> 18
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> C terminal de BglII y B7
 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(8)
 <223> Sitio BglII
 15 <400> 12
 gaagatcttt acagggcg 18

<210> 13
 20 <211> 87
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 25 <223> Cebador 5' para Mph-1-A1A2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(9)
 30 <223> Sitio BamHI

<400> 13
 cgcggtatcct atgcacgtgt tcggaggcgt ggaccccgcc gcgggtctag attcctgaga 60
 gtgaagttca gcaggagcgc agagccc 87

35 <210> 14
 <211> 72

<212>ADN

<213>Secuencia Artificial

<220>

5 <223>Cebador 3' para Mph-1-A1A2

<220>

<221>misc_feature

<222>(4)..(9)

10 <223>Sitio HindIII

<400>14

cccaagcttc ttgtcatagt cgtccttgta gtcgcggccg ccgcgagggg gcagggcctg 60

catgtgaagg_gc 72

15 <210>15

<211>75

<212>ADN

<213>Secuencia Artificial

20 <220>

<223>Cebador 5' para Mph-1-CTLA4

<220>

<221>misc_feature

25 <222>(4)..(9)

<223>Sitio BamHI

<400>15

cgcggatcct atgcacgtgt tcggaggcgt ggaccccgcc gcgggtctag aaaaatgcta 60

aagaaaagaa gccct 75

30

<210>16

<211>72

<212>ADN

<213>Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador 3' para Mph-1-CTLA4

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (4)..(9)

<223> Sitio HindIII

<400> 16

cccaagcttc ttgtcatagt cgtccttgta gtcgcggccg ccattgatgg gaataaaata 60

10 aggcgtgaaat tg 72

<210> 17

<211> 73

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador 5' para Mph-1-insulina

20 <220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(9)

<223> Sitio BamHI

25 <400> 17

cgcggatcct atgcacgtgt tcggaggcgt ggaccccgcc gcgggcaggg ttccagggtg 60

gctggacccc agg 73

<210> 18

<211> 77

30 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador 3' para Mph-1-insulina

<220>

<221>misc_feature

<222>(4)..(9)

<223>Sitio HindIII

5

<400>18

cccaagcttc ttgtcatagt cgtccttgta gtcgcggccg cgtcgggttca agggctttat 60

tccatctctc tcggtgc 77

REIVINDICACIONES

1. Motivo de transducción biomolecular Mph-1-BTM que consiste en la
5 secuencia de aminoácidos SEQ. ID No.: 1 para la transducción de una
molécula funcional y/o reguladora biológicamente activa en células
procariotas o células eucariotas.
2. Procedimiento para la producción de una proteína de fusión heteróloga
del motivo de transducción biomolecular según la reivindicación 1 y una
proteína heteróloga deseada, que incluye el paso de
10 a. transformar una célula huésped adecuada con un vector de
expresión recombinante que comprende ADN o ARN que codifica
el motivo de transducción molecular y ADN o ARN que codifica la
proteína deseada.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el vector
15 de expresión recombinante comprende además ADN que codifica una o
más proteínas homólogas o heterólogas como una molécula reguladora
funcional biológicamente activa y una secuencia reguladora de expresión
unida funcionalmente.
4. Procedimiento según la reivindicación 2 ó 3, caracterizado porque el
20 vector de expresión recombinante comprende además ADN o ARN que
codifica una proteína de unión de ADN o ARN que se une a una
secuencia de ADN o ARN específica, o un ADN o ARN deseado a
transducir en células, un fragmento de ADN o ARN que contiene una o
25 más secuencias de ácido nucleico sucesivas que se unen selectivamente
a una proteína de unión de ADN o ARN y una secuencia reguladora de
expresión unida funcionalmente.
5. Procedimiento según una o más de las reivindicaciones 3 a 4,
caracterizado porque la secuencia reguladora de expresión es un dominio
regulador que incluye un promotor o potenciador específico de células,
30 tejidos u órganos en los que se transduce y expresa selectivamente el
ADN o ARN deseado.

6. Procedimiento según una o más de las reivindicaciones 2 a 5, caracterizado porque el vector de expresión recombinante se transduce en células procariotas o en células eucariotas.
- 5 7. Procedimiento según una o más de las reivindicaciones 2 a 6, caracterizado porque el vector de expresión recombinante comprende: una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que es reconocida y cortada por la proteasa presente en una superficie celular; y un ectodominio que codifica ADN de un ligando que se une específicamente a un receptor presente característicamente en la
10 superficie de la célula, tejido u órgano en el que se transduce la proteína deseada, o ADN que codifica un anticuerpo monoclonal (mAb) que se une específicamente al receptor.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque la proteasa presente específicamente en la superficie de la célula es MMP
15 (metaloproteasa de matriz).
9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, caracterizado porque el mAb es un fragmento Fab, un fragmento F (ab'), un Fv de cadena simple o mAb humanizado.
10. Procedimiento según una o más de las reivindicaciones 2 a 9, caracterizado porque el vector de expresión recombinante comprende
20 adicionalmente una secuencia tag para la purificación de la proteína deseada.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque el vector de expresión recombinante comprende adicionalmente seis codones de
25 histidina sucesivos.
12. Procedimiento según una o más de las reivindicaciones 2 a 11, caracterizado porque el vector de expresión recombinante comprende adicionalmente una secuencia de aminoácidos que es reconocida específicamente y cortada por una enzima intracelular.
- 30 13. Procedimiento según una o más de las reivindicaciones 7 a 12, caracterizado porque la secuencia de aminoácidos que es reconocida específicamente y cortada por una enzima intracelular es el sitio de corte

de enteroquinasa Asp-Asp-Asp-Asp-Lys o el sitio de corte tev de Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly.

- 5 **14.** Procedimiento según una o más de las reivindicaciones 2 a 13, caracterizado porque el vector de expresión recombinante comprende adicionalmente una o más glicinas y aminoácidos espaciadores o ácidos nucleicos, incluyendo aminoácidos AYY, para la estabilidad estructural y funcional o para la flexibilidad de la proteína.

FIG.1A

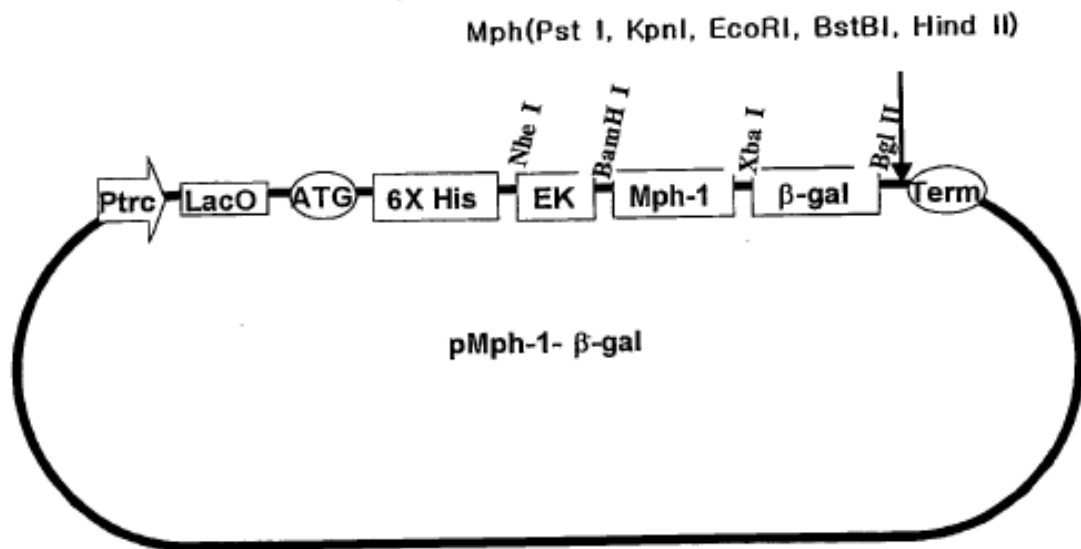


FIG.1B



FIG.2

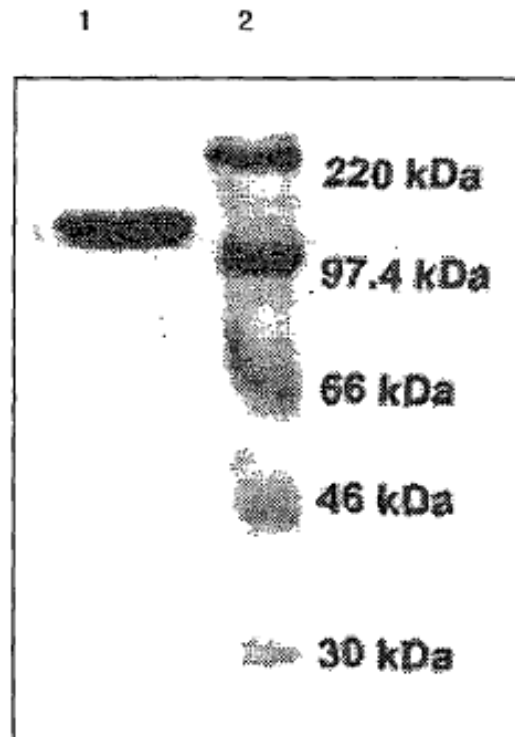


FIG. 3A

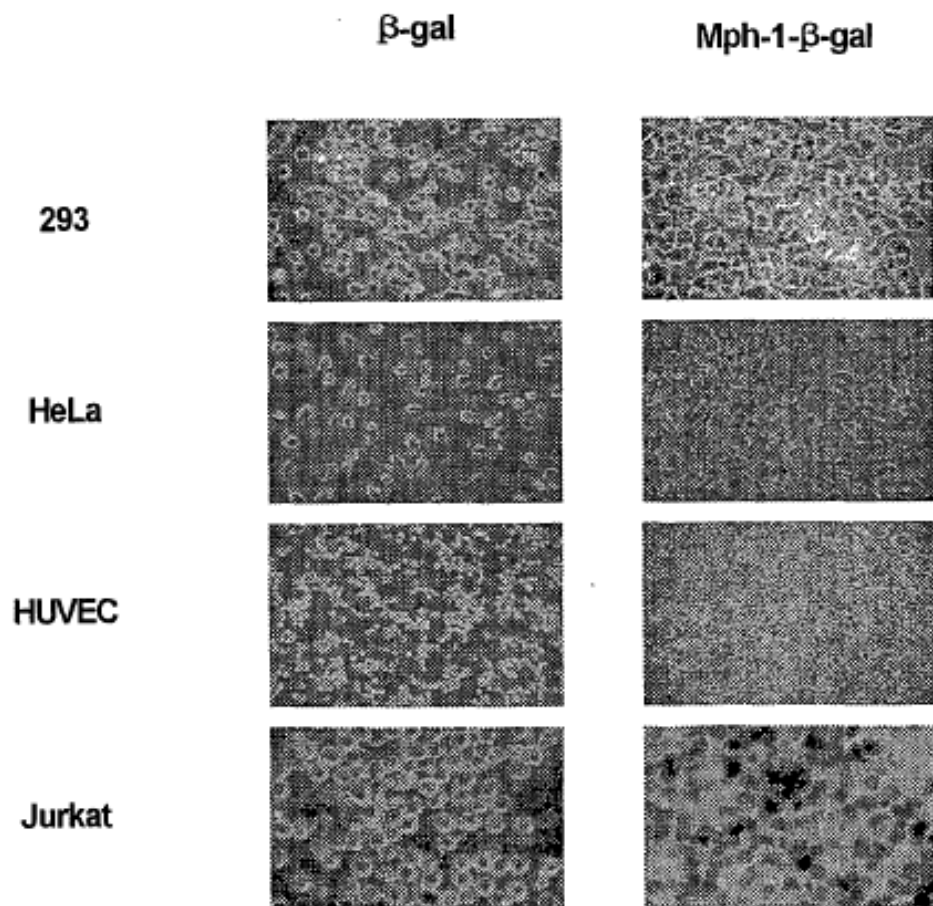


FIG.3B

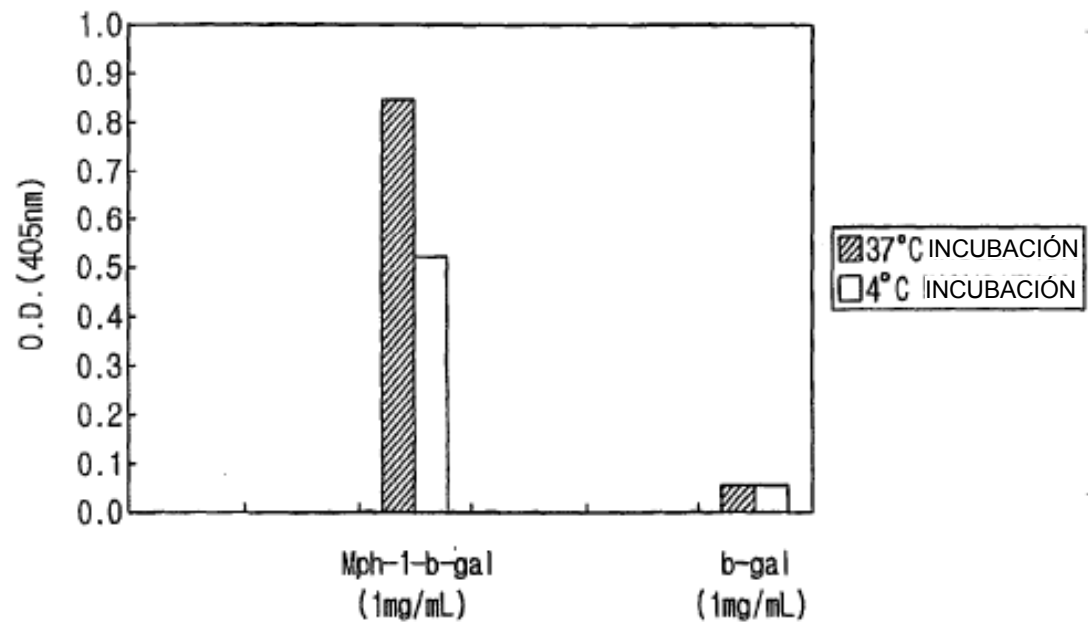


FIG.4A

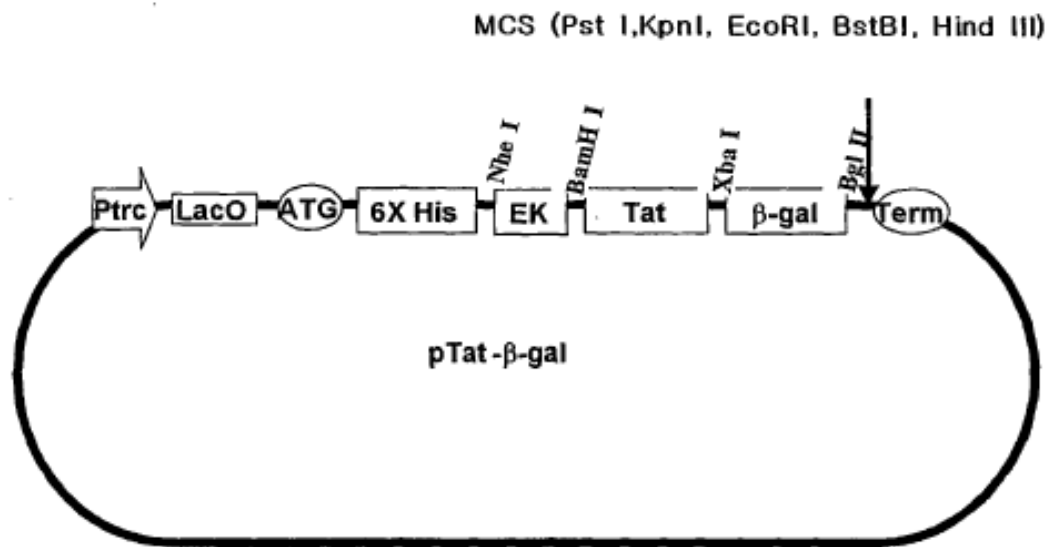


FIG.4B

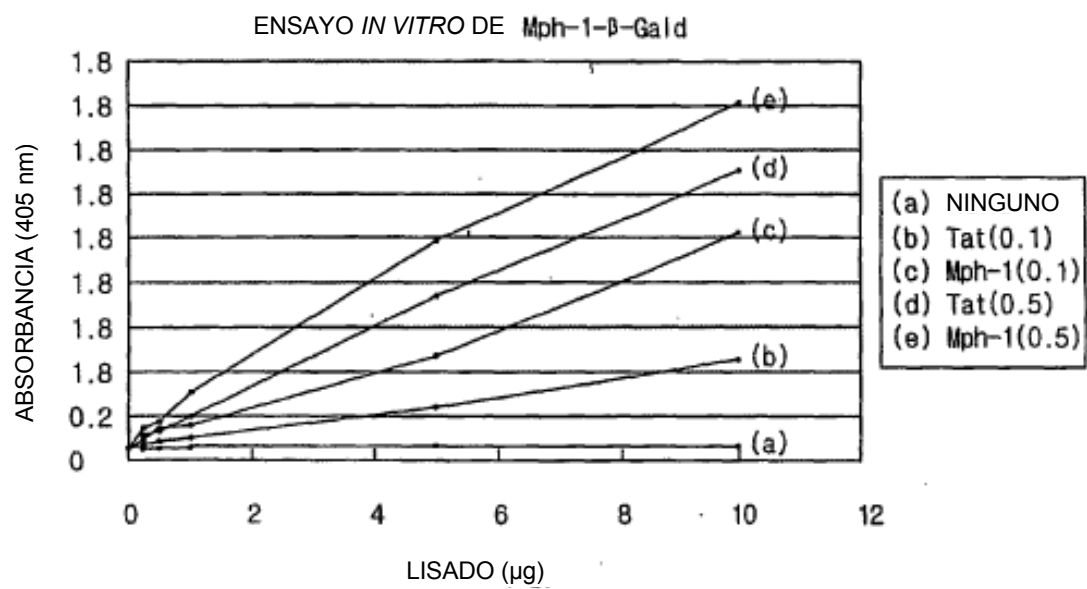
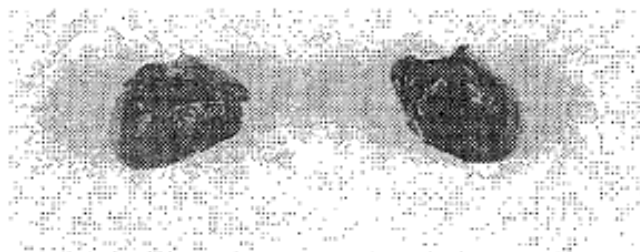


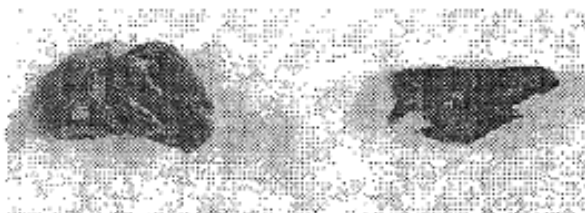
FIG.5A

(i) corazón



β -Gal Mph-1 - β -Gal

(ii) pulmón



β -Gal Mph-1 - β -Gal

(iii) riñón



β -Gal Mph-1 - β -Gal

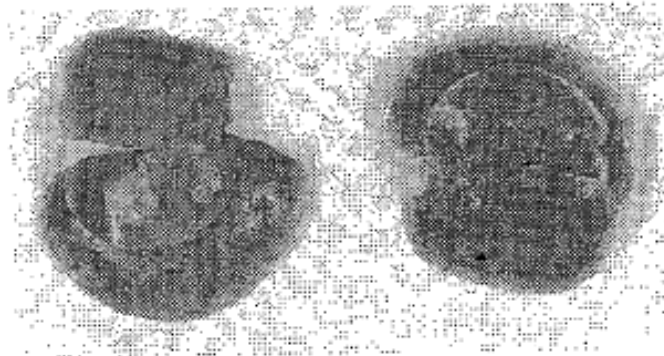
(iv) cerebro



β -Gal

Mph-1- β -Gal

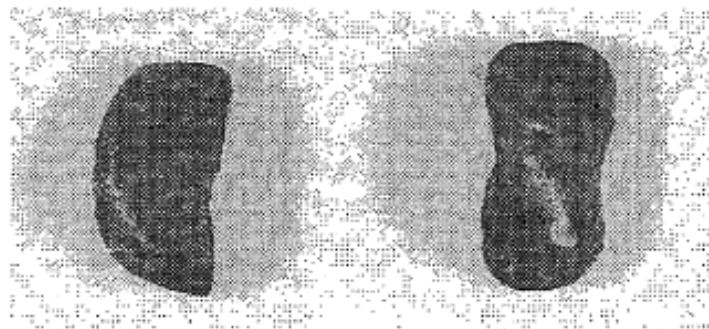
(v) hígado



β -Gal

Mph-1- β -Gal

(vi) riñón



β -Gal

Mph-1- β -Gal

FIG. 5B

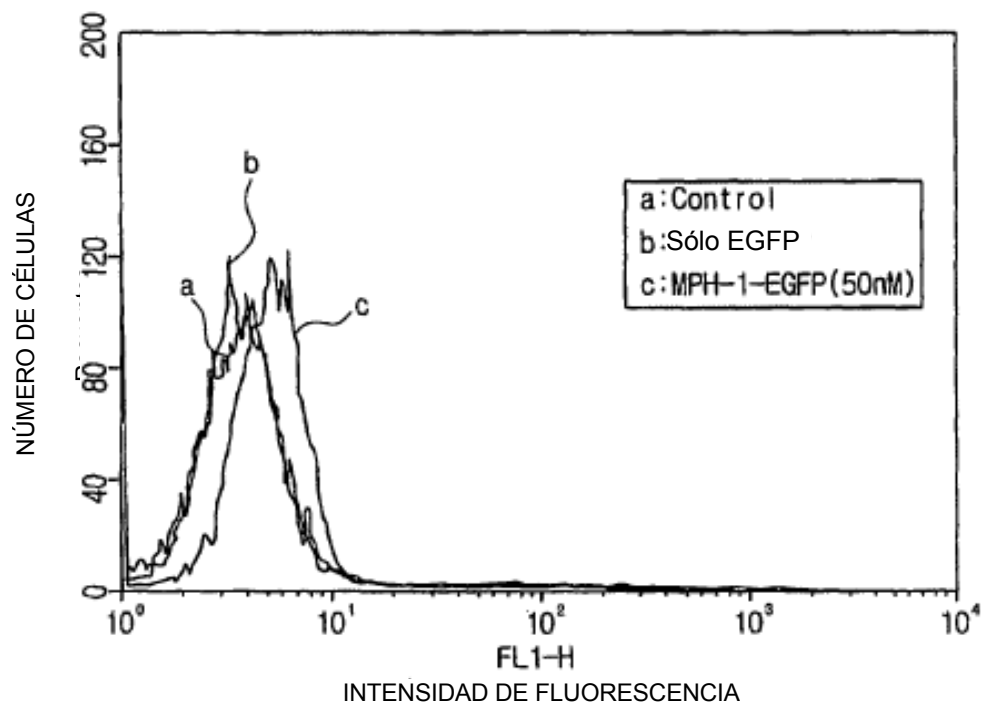


FIG. 5C

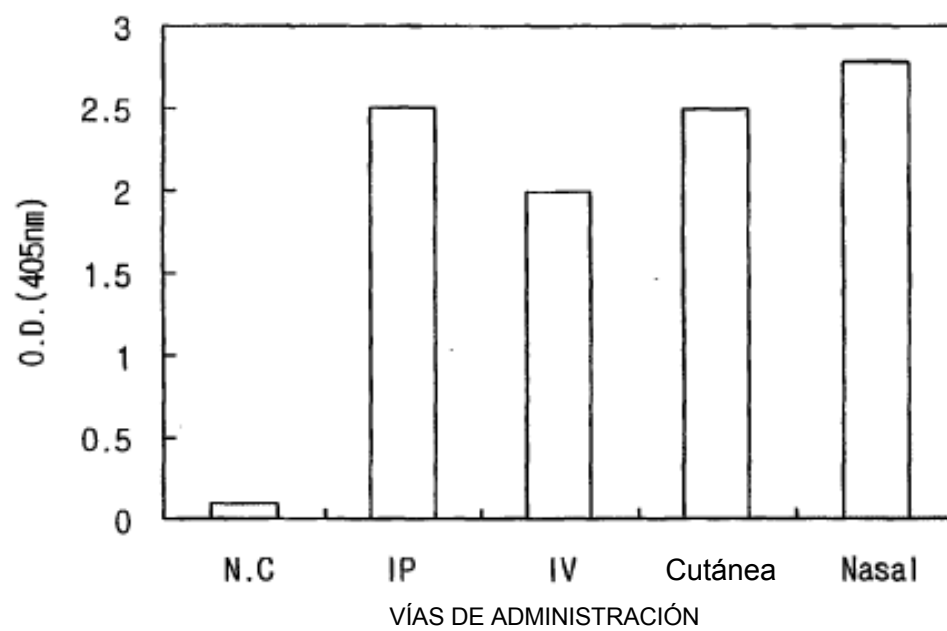
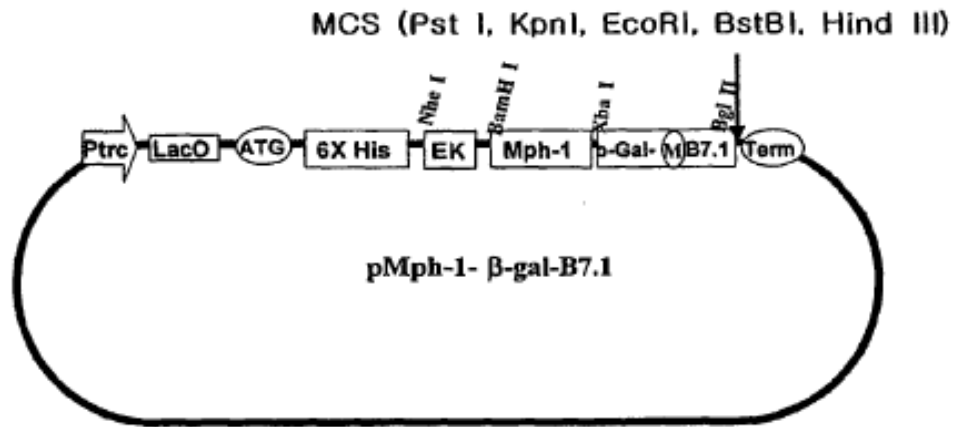
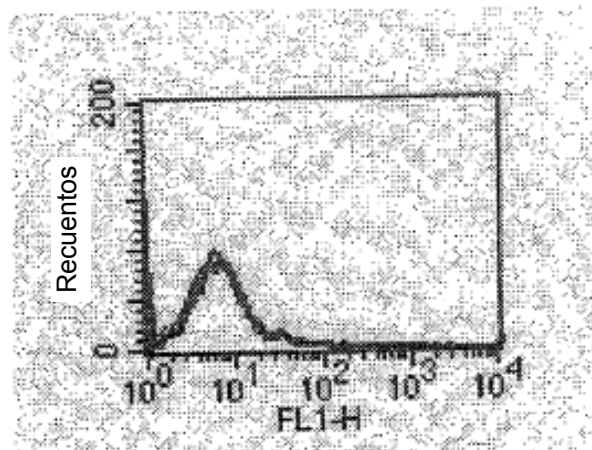


FIG.6A

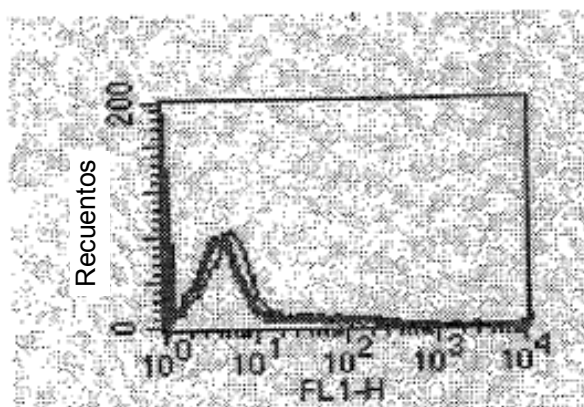


M = SITIO DE CORTE DE **MMP** ESPECÍFICO DE CÉLULAS T

FIG.6B
Control de isotipos



Célula B



Célula T

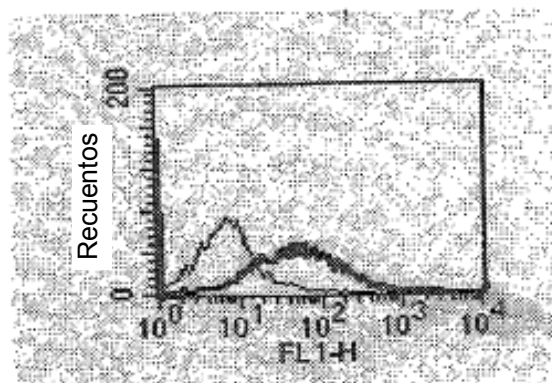


FIG.7A

MCS (Pst I, KpnI, EcoRI, BstBI, Hind III)

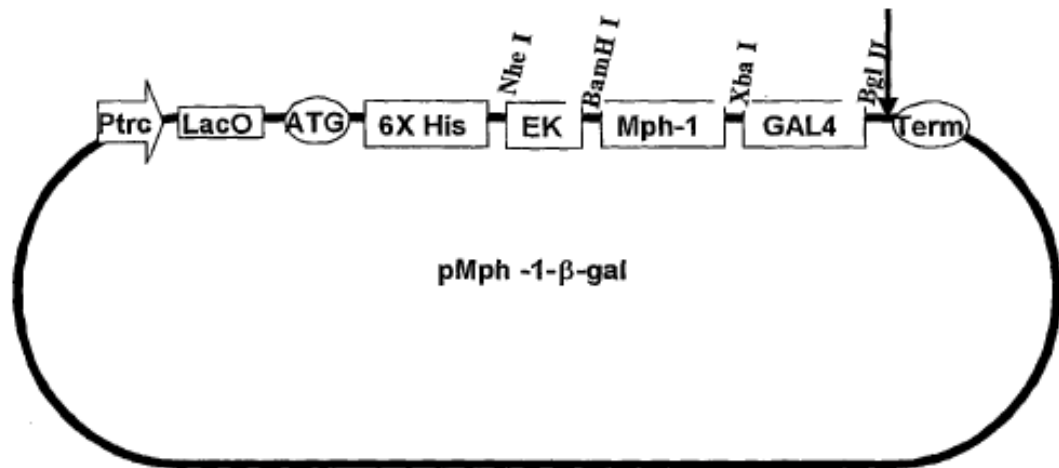


FIG. 8

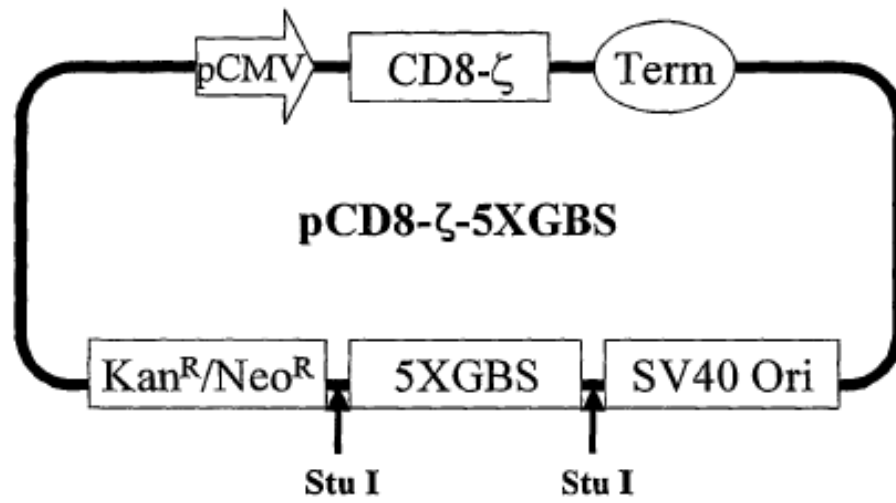
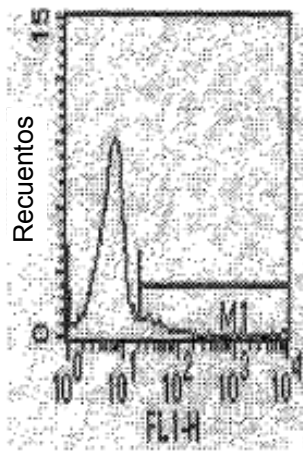
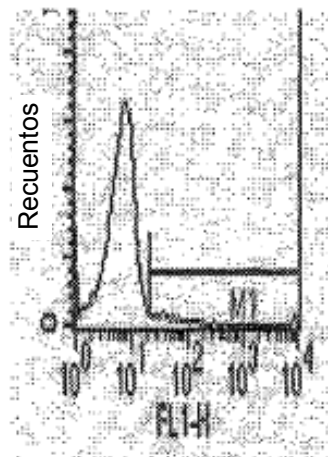


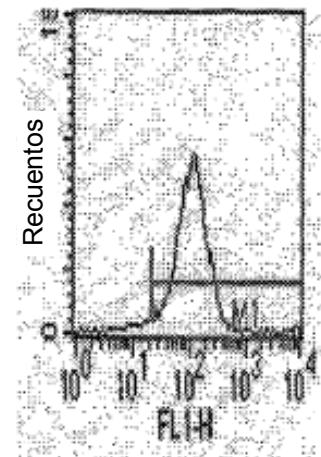
FIG. 9A



Mph-1



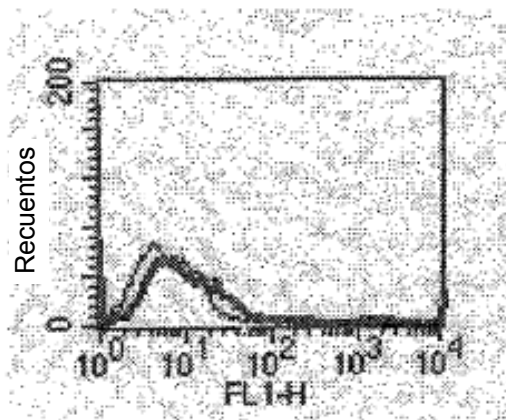
pCD8- ζ -5XGBS



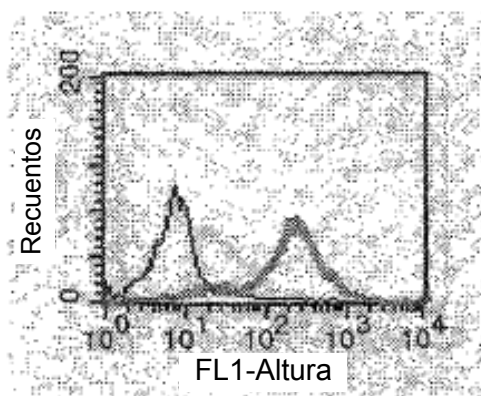
**Mph-1
+ pCD8- ζ -5XGBS**

FIG. 9B

Control de isotipos



Esplenocito



Célula T

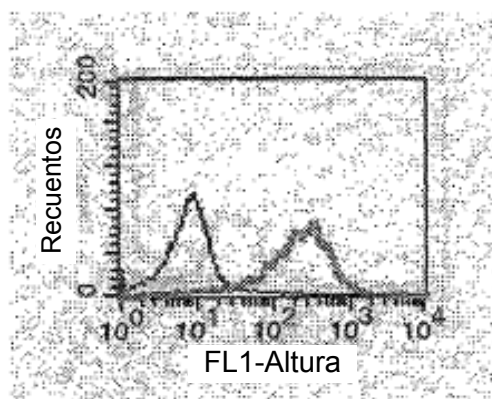
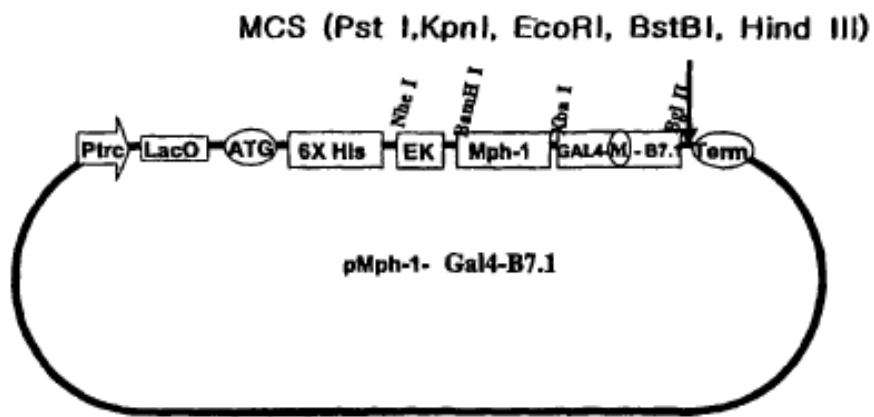


FIG. 10A



M = SITIO DE CORTE DE **MMP** ESPECÍFICO DE CÉLULAS T

FIG. 10B

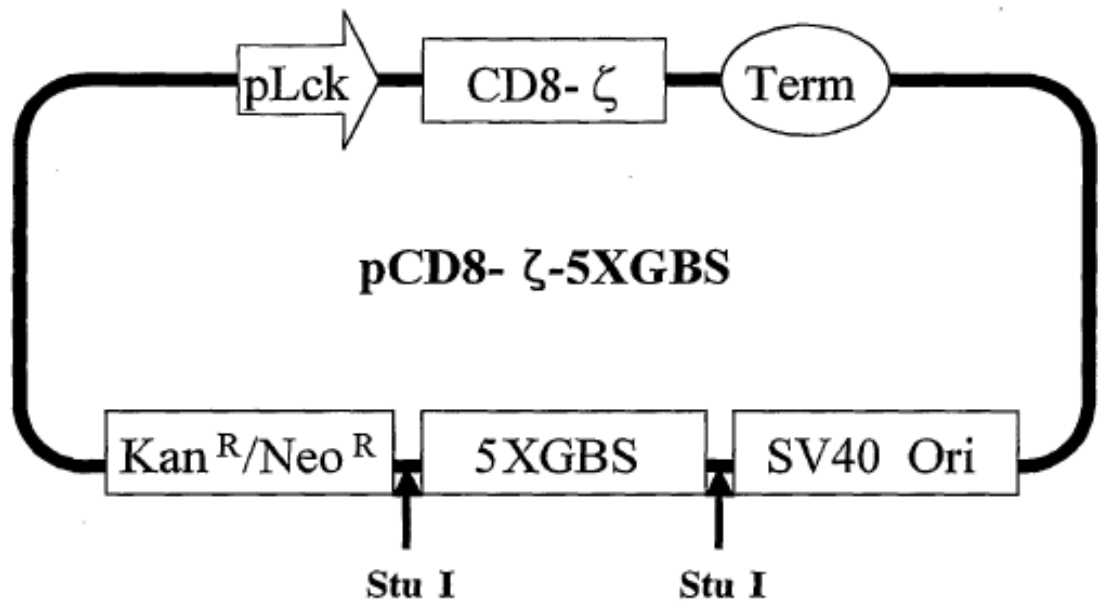
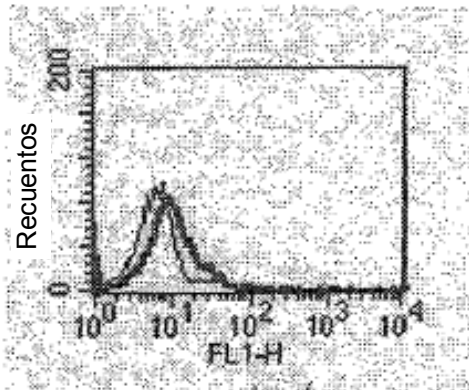
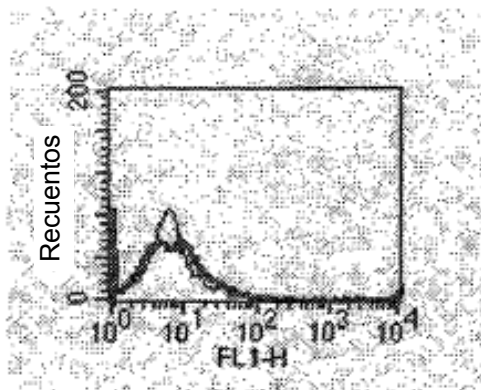


FIG. 10C

Control de isotipos



Célula B



Célula T

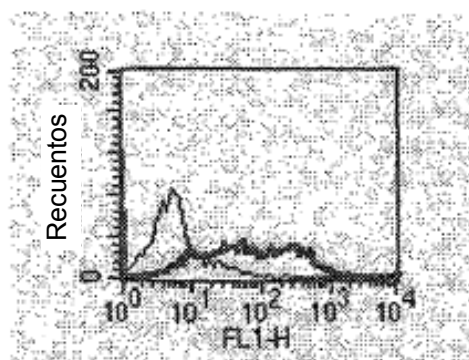
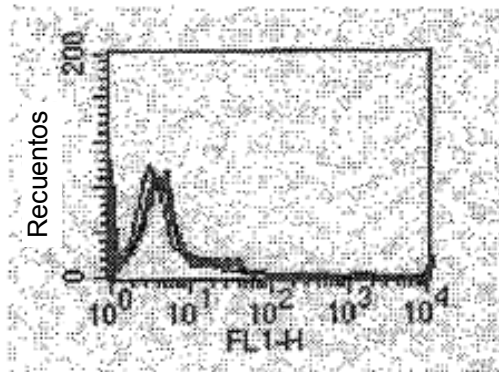
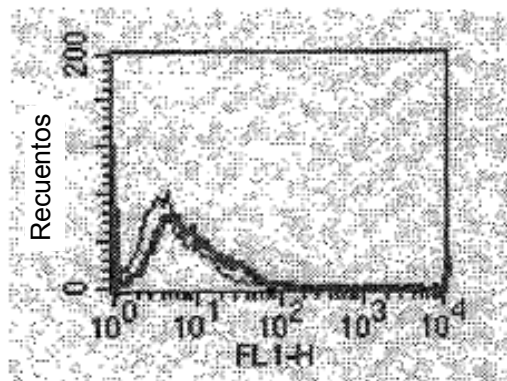


FIG. 10D

Control de isotipos



Célula B



Célula T

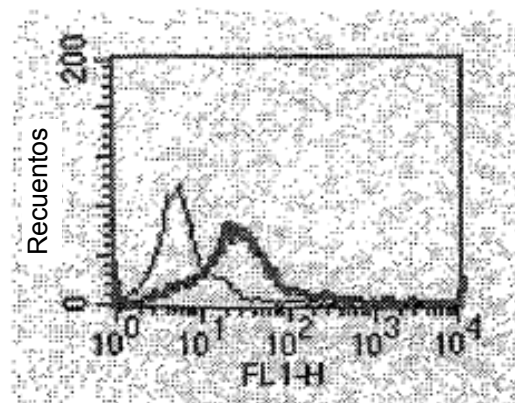


FIG. 11A

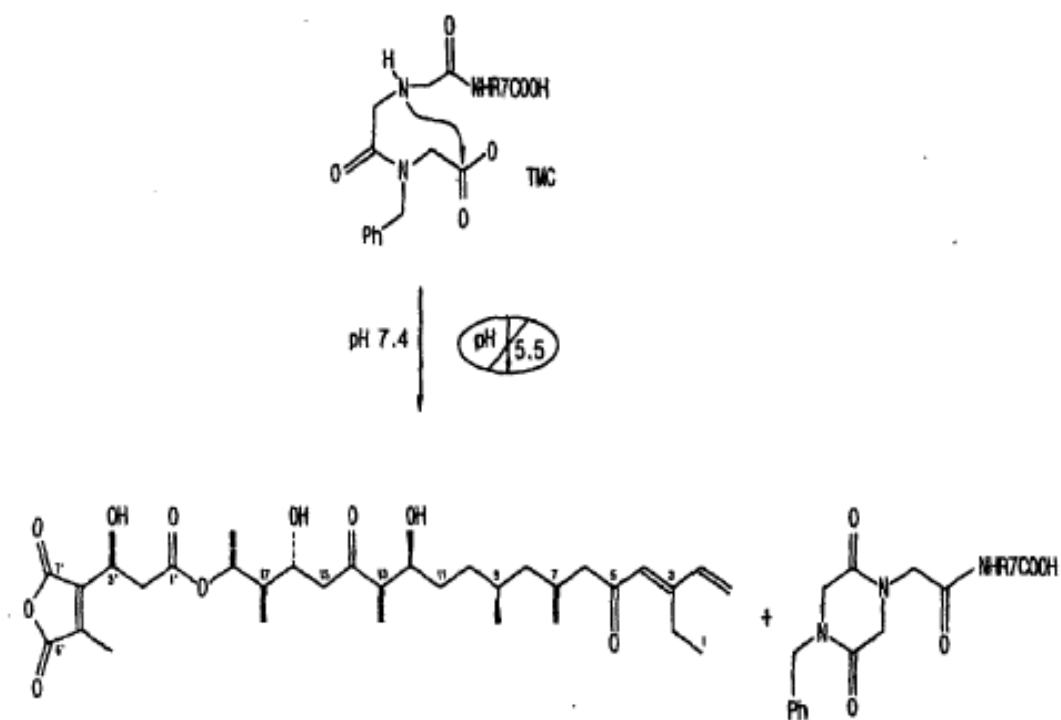


FIG.11B

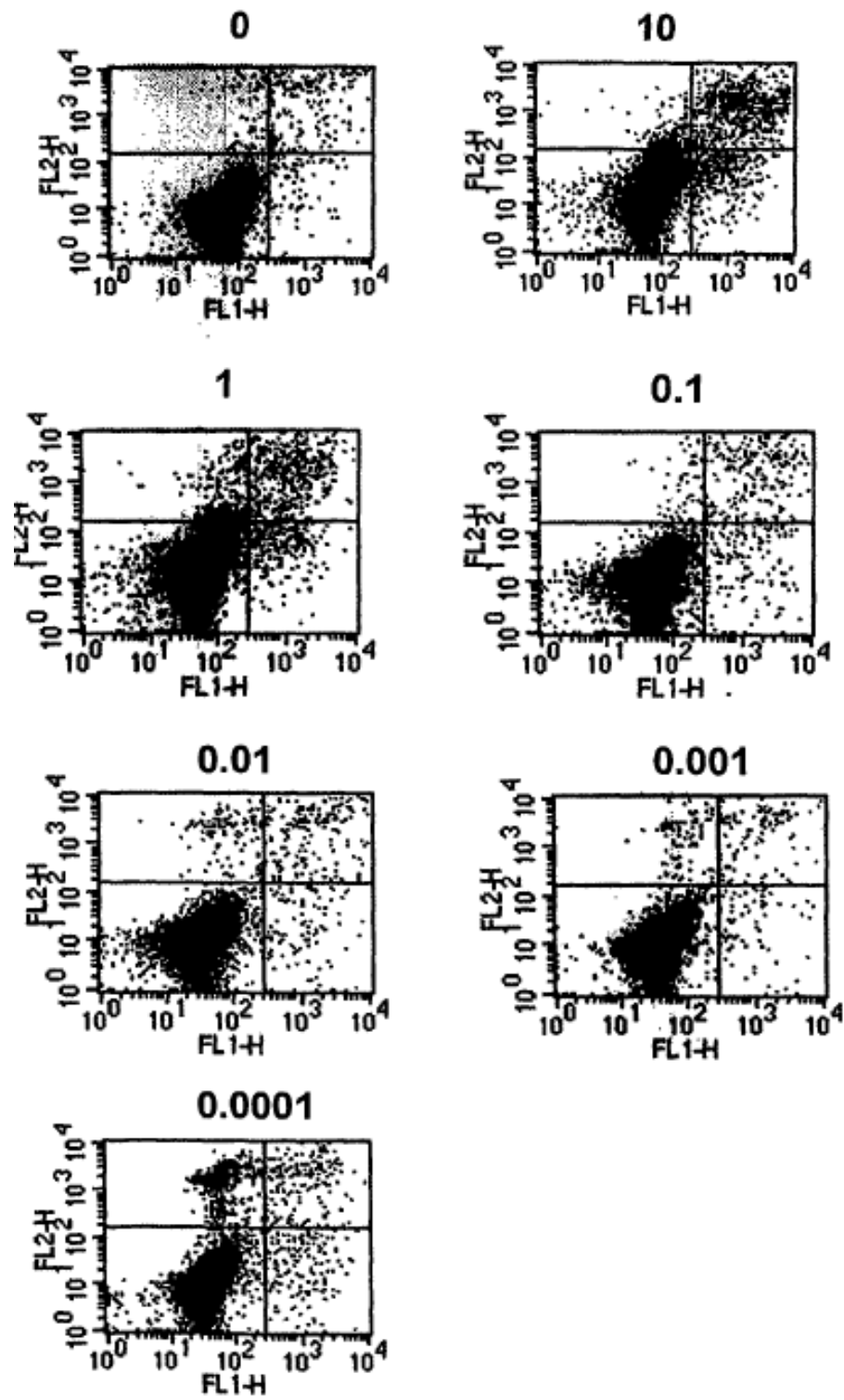


FIG. 12

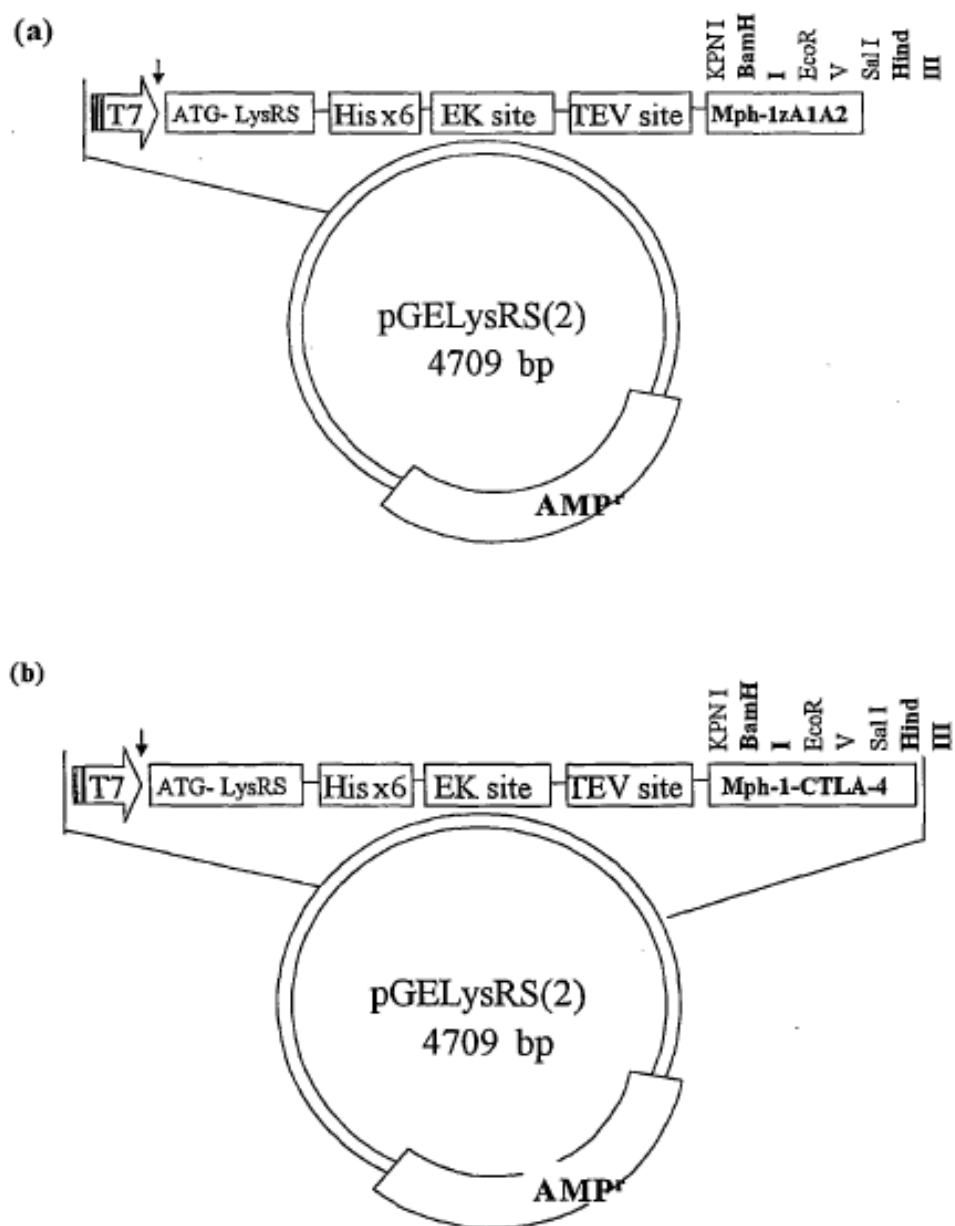
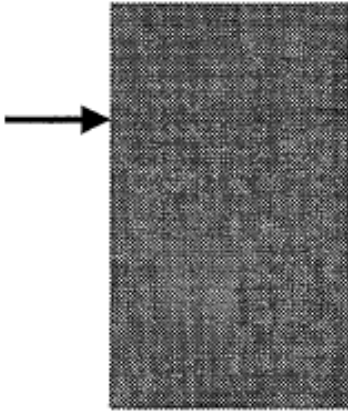


FIG. 13

(a)



(b)

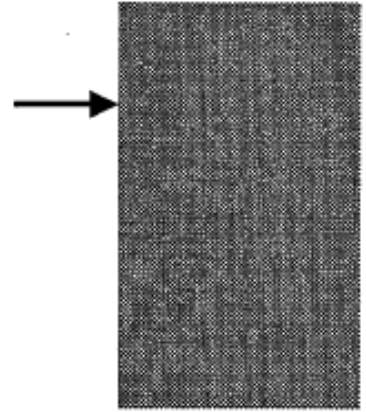
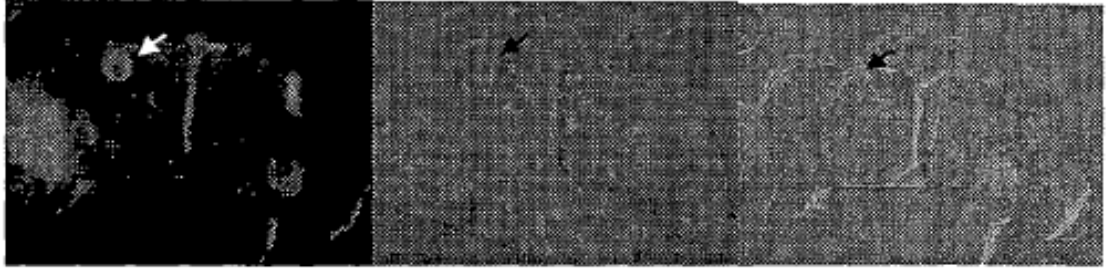


FIG. 14

15 min después



30 min después

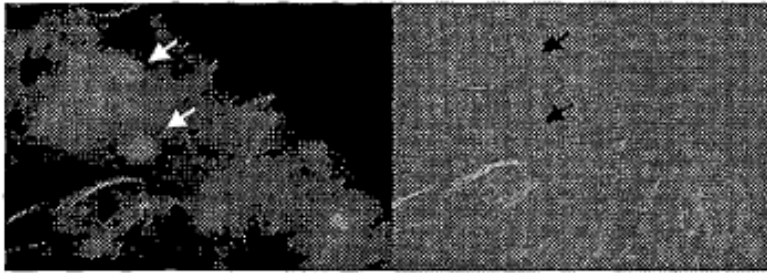


FIG. 15

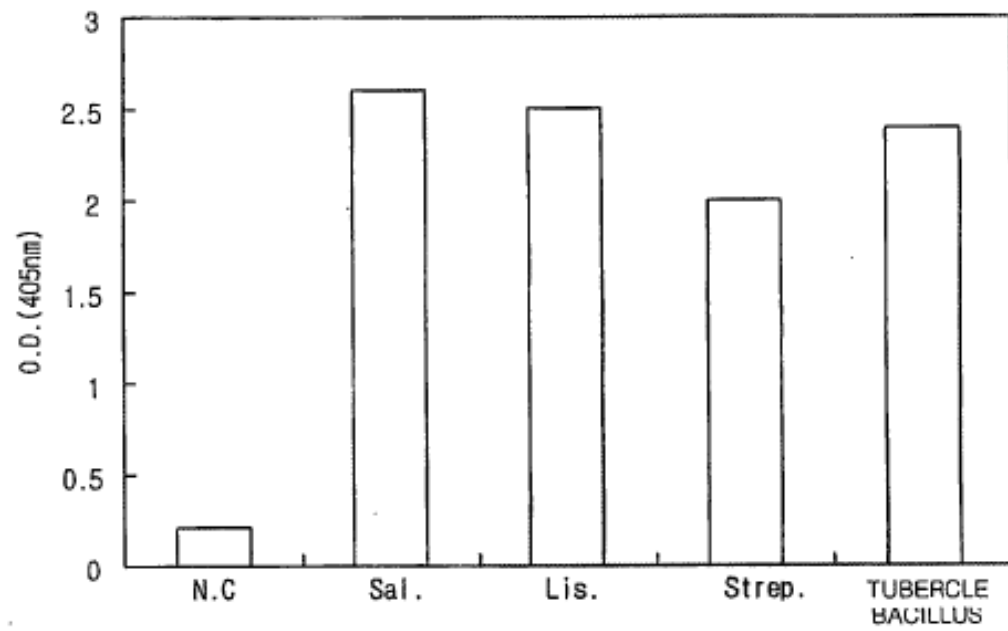


FIG. 16

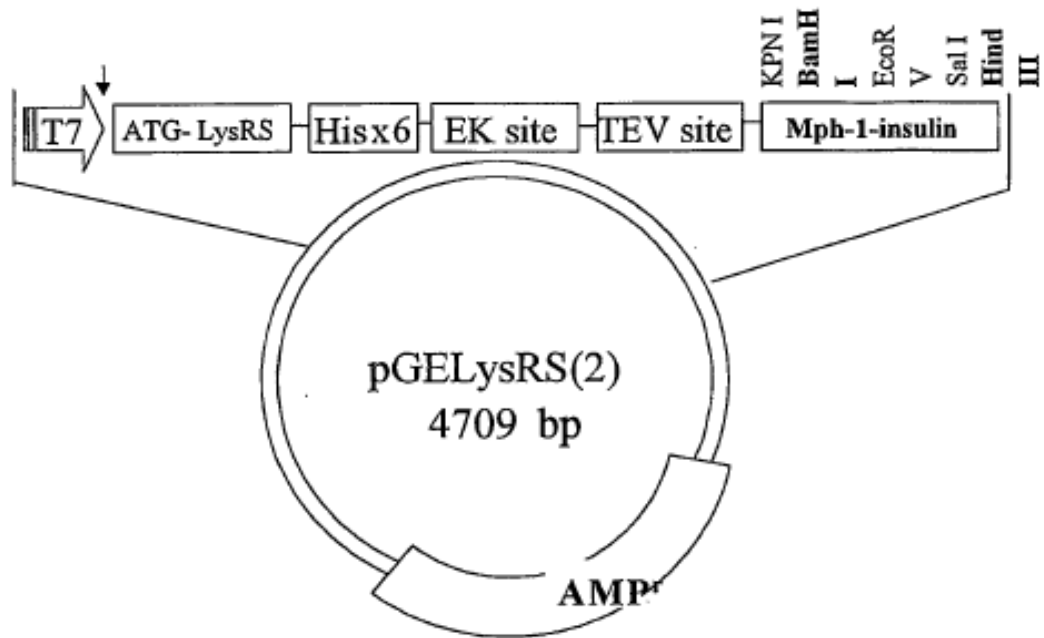


FIG. 17A

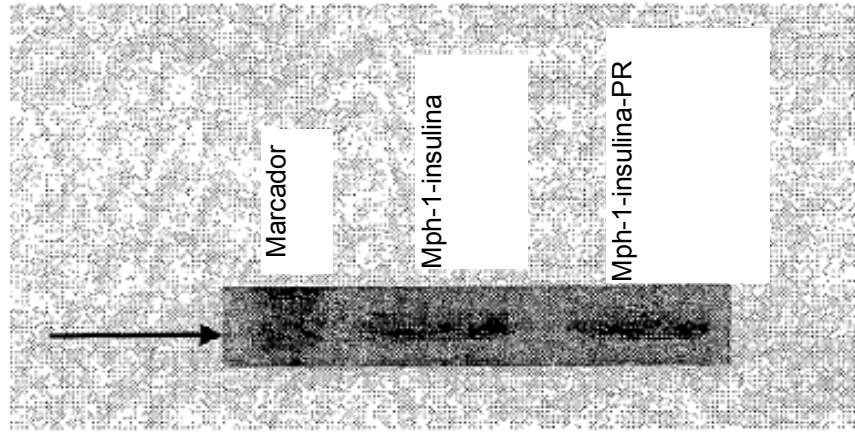
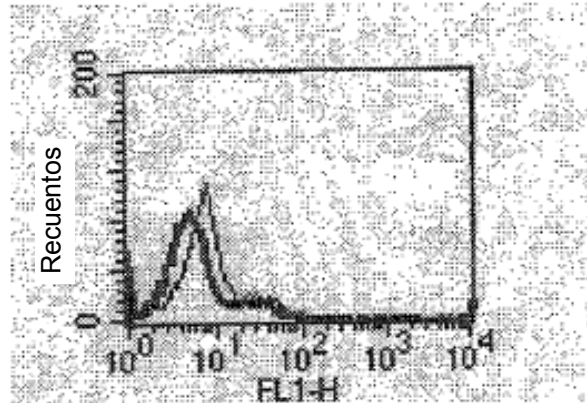
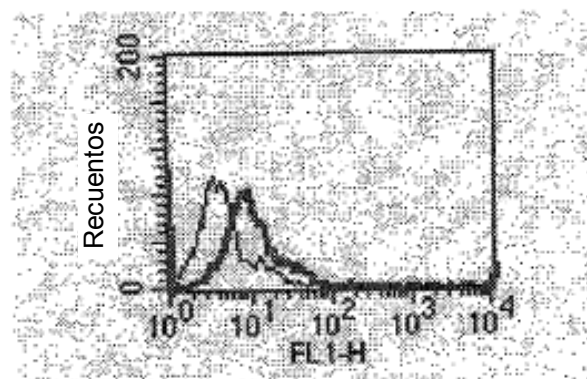


FIG. 17B

Insulina recombinante



Mph-1-insulina



Mph-1-insulina-PR

