

66



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

U. Nacional
Digitalización CSJ-LIC

BT

PCT

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

INVENTARIO

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ok

09-79071

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

MOLECULAS DE TRANSPORTE QUE UTILIZAN POLIPEPTIDOS

HIV-TAT DE SECUENCIA INVERSA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

REVANCE THERAPEUTICS, INC.

DOMICILIO

NEWARK, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C.,

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

OK

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-079071- -00000-0000

Fecha: 2009-07-29 16:39:27

Dep. 2020 NUECREACIONE

Tra. 11 PATENTEIYH

Eve: 378 FASENACIONAL

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 76

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:**

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **REVANCE THERAPEUTICS, INC.**
Sociedad constituida y existente bajo las
leyes del Estado de Delaware, Estados
Unidos de América.Dirección: 7555 Gateway Blvd,
Newark,
California 94560,
Estados Unidos de AméricaDomicilio: Newark,
California,
Estados Unidos de América**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 35.456.344T.P 23.555

4

**INVENTOR (ES)
(72)****1. Jacob M. WAUGH**
4020 El Camino Real # 1116,
Mountain View,
California 94040,
Estados Unidos de América**2. Jae Hoon LEE**
34243 Tartarian Way,
Union City,
California 94587,
Estados Unidos de América

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/US2007/087241Fecha: 12 de diciembre de 2007Publicación Internacional No. WO 2008/082885 A2Fecha: 10 de julio de 2008

6

Título (54)**MOLECULAS DE TRANSPORTE QUE UTILIZAN POLPÉPTIDOS HIV-TAT DE
SECUENCIA INVERSA**

7

Clasificación Internacional (51) A61K 051/006

8

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐US29 de diciembre de 200660/882,639

9

Comprobante de pago No.: 09-49,147**Fecha: 7 de julio de 2009**

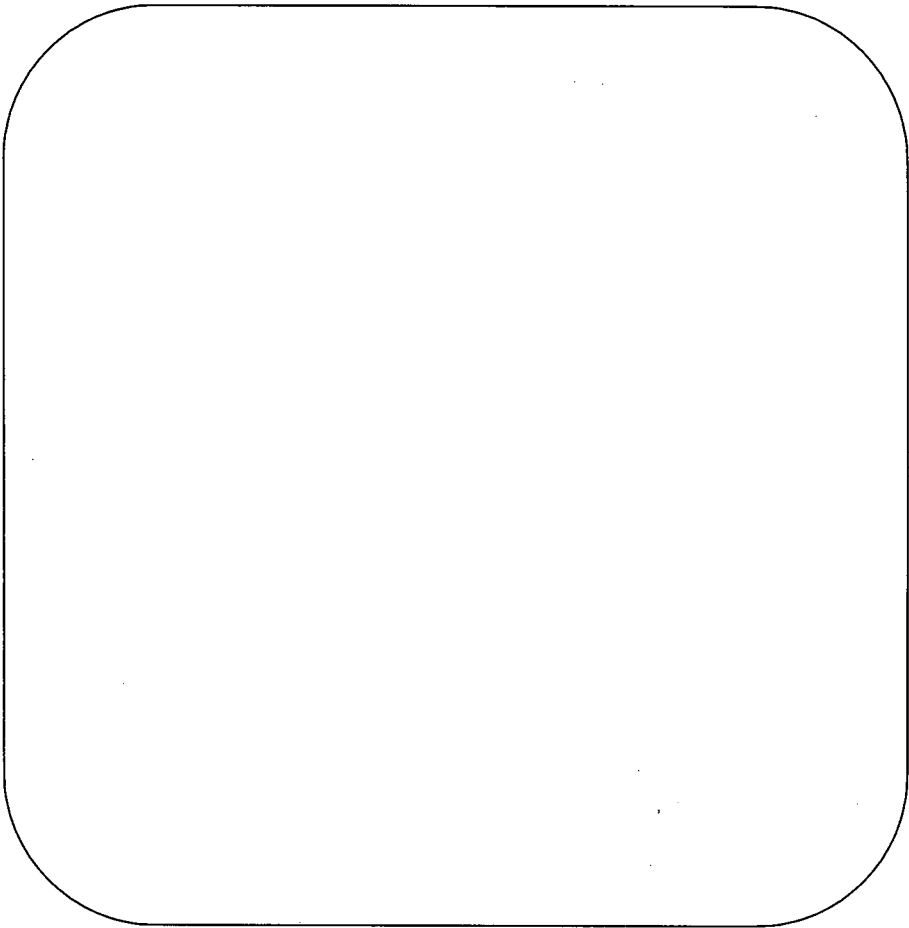
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 540.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la decimoquinta reivindicación por.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : *Luiz Clemencia De Paez*
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23555

SCT

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/082885 A2

Descripción:

Páginas 24 en el idioma original

Páginas 34 en español

Reivindicaciones: Número (s) 15

Figuras: Número (s) 1

2. ☒ Forma PCT/IB/306. Notificación de la inscripción del cambio de dirección del solicitante

REVANCE THERAPEUTICS, INC,

3. ☒ Extracto de publicación.

4. ☒ Listado de Secuencias.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 July 2008 (10.07.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/082885 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 51/06 (2006.01)

(74) Agent: ENG, Joseph, D., Jr.; King & Spalding LLP, 1185
Avenue of the Americas, New York, NY 10036 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2007/087241

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,
PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(22) International Filing Date:
12 December 2007 (12.12.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/882,639 29 December 2006 (29.12.2006) US

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): RE-
VANCE THERAPEUTICS, INC. [US/US]; 2400
Bayshore Parkway, Suite 100, Mountain View, California
94043 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): WAUGH, Jacob M.
[US/US]; 4020 El Camino Real #1116, Mountain View,
California 94040 (US). LEE, Jae Hoon [US/US]; 34243
Tartarian Way, Union City, California 94587 (US).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

(54) Title: TRANSPORT MOLECULES USING REVERSE SEQUENCE HIV-TAT POLYPEPTIDES

(57) Abstract: This invention relates to novel transport molecules that comprise a polypeptide comprising amino acid residues arranged in a sequence that is the reverse-sequence of basic portion of the HIV-TAT protein. The novel transport polypeptides are useful for transmembrane or intracellular delivery of cargo molecules, non-limiting examples of which include polypeptides and nucleic acids. The novel transport polypeptides may be covalently or non-covalently bound to the cargo molecules.



WO 2008/082885 A2

Transport Molecules Using Reverse Sequence HIV-TAT Polypeptides

CROSS-REFERENCES TO RELATED APPLICATIONS

This application claims priority to U.S. Provisional Application Serial No. 60/882,639, filed December 29, 2006, the contents of which are incorporated herein by reference in its entirety.

TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION

[0001] This invention relates to novel transport molecules that comprise a polypeptide having amino acid residues arranged in a sequence that is the reverse-sequence of the basic portion of the HIV-TAT protein. The novel transport molecules are useful for transmembrane or intracellular delivery of cargo molecules, non-limiting examples of which include polypeptides and nucleic acids. The novel transport molecules may be covalently or non-covalently bound to the cargo molecules. The reduced size of the preferred transport molecule of this invention also minimizes interference with the biological activity of the cargo molecule.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] Transmembrane or intracellular delivery of diagnostic or therapeutic agents is often complicated by the inability of such agents to reach the tissues or intracellular sites of interest. This complication may arise, in part, because the membrane organism have evolved to keep out external compounds as a way of protecting the organism.

[0003] Consider, for example, the complex structure of human skin, which protects the body's organs from external environmental threats and acts as a thermostat to maintain body temperature. Skin consists of several different layers, each with specialized functions. The major layers include the hypodermis, the dermis and the epidermis. The hypodermis is the deepest layer of the skin. It acts both as an insulator for body heat conservation and as a shock absorber for organ protection (Inlander, Skin, New York, N.Y.: People's Medical Society, 1-7 (1998)). In addition, the hypodermis also stores fat for energy reserves. The pH of skin is normally between 5 and 6. This acidity is due to the presence of amphoteric amino acids, lactic acid, and fatty acids from the secretions of the sebaceous glands. The term "acid mantle" refers to the presence of the water-soluble substances on most regions of the skin. The buffering capacity of the skin is due in part to these secretions stored in the skin's horny layer.

[0004] The dermis, which lies above the hypodermis, is 1.5 to 4 millimeters thick. It is the thickest of the three layers of the skin. In addition, the dermis is also home to most of the skin's structures, including sweat and oil glands (which secrete substances through openings in the skin called pores, or comedos), hair follicles, nerve endings, and blood and lymph vessels (Inlander, Skin, New York, N.Y.: People's Medical Society, 1-7 (1998)). However, the main components of the dermis are connective tissue such as collagen and elastin.

[0005] The epidermis is a stratifying layer of epithelial cells that overlies the dermis and is the topmost layer of skin. The epidermis is only 0.1 to 1.5 millimeters thick (Inlander, Skin, New York, N.Y.: People's Medical Society, 1-7 (1998)), consists of keratinocytes, is divided into several layers based on their state of differentiation. The epidermis can be further classified into the stratum corneum and the viable epidermis, which consists of the granular malpighian and basal cells.

[0006] One significant problem in applying physiologically active agents topically or transdermally is that skin is an effective barrier to penetration. The oily nature of the stratum corneum and the tight compaction of its cells provide an effective barrier against gaseous, solid or liquid chemical agents, whether used alone or in water or in oil solutions. Thus, the stratum corneum frustrates efforts to apply therapeutic, cosmetic, or diagnostic agents topically to local areas of the body. This is problematic, because many physiologically active agents ideally should be applied topically in a localized area to achieve sufficiently high local concentrations of the agent to have a therapeutic benefit, without systemic overdose. Additionally, often absorption of a therapeutic or diagnostic agent via gastrointestinal tract is undesirable because it can lead to unwanted chemical alteration of the agent via normal metabolic processes.

[0007] Besides macroscopic structures such as skin, cells are generally impermeable or nearly impermeable to many therapeutic or diagnostic agents, particularly if the agents are macromolecules, such as proteins and nucleic acids. Moreover, some small molecules enter living cells at very low rates. The lack of means for delivering macromolecules into cells in vivo has been an obstacle to the therapeutic,

prophylactic and diagnostic use of a potentially large number of therapeutic and diagnostic agents having intracellular sites of action, such as proteins and nucleic acids.

[0008] Various methods have been developed for delivering macromolecules into cells in vitro. A list of such methods includes electroporation, membrane fusion with liposomes, high velocity bombardment with DNA-coated microprojectiles, incubation with calcium-phosphate-DNA precipitate, DEAE-dextran mediated transfection, infection with modified viral nucleic acids, and direct micro-injection into single cells. These in vitro methods typically deliver the nucleic acid molecules into only a fraction of the total cell population, and they tend to damage large numbers of cells. Experimental delivery of macromolecules into cells in vivo has been accomplished with 'scrape loading, calcium phosphate precipitates and liposomes. However, these techniques have, to date, shown limited usefulness for in vivo cellular delivery. Moreover, even with cells in vitro, such methods are of extremely limited usefulness for delivery of proteins.

[0009] General methods for efficient delivery of biologically active proteins into intact cells, in vitro and in vivo, are needed. (L. A. Sternson, "Obstacles to Polypeptide Delivery", Ann. N.Y. Acad. Sci, 57, pp. 19-21 (1987)). Chemical addition of a lipopeptide (P. Hoffmann et al., "Stimulation of Human and Murine Adherent Cells by Bacterial Lipoprotein and Synthetic Lipopeptide Analogues", Immunobiol., 177, pp. 158-70 (1988)) or a basic polymer such as polylysine or polyarginine (W.-C. Chen et al., "Conjugation of Poly-L-Lysine Albumin and Horseradish Peroxidase: A Novel Method of Enhancing the Cellular Uptake of Proteins", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, pp. 1872-76 (1978)) have not proved to be highly reliable or generally useful. Folic acid has been used as a transport moiety (C. P. Leamon and Low, Delivery of Macromolecules into Living Cells: A Method That Exploits Folate Receptor Endocytosis", Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88, pp. 5572-76 (1991)). Evidence was presented for internalization of folate conjugates, but not for cytoplasmic delivery. Given the high levels of circulating folate in vivo, the usefulness of this system has not been fully demonstrated. Pseudomonas exotoxin has also been used as a transport moiety (T. I. Prior et al., "Barnase Toxin: A New Chimeric Toxin Composed of Pseudomonas Exotoxin A and Barnase", Cell, 64, pp. 1017-23 (1991)). The efficiency and general applicability of this system for the

intracellular delivery of biologically active cargo molecules is not clear from the published work, however.

[0010] One previously reported method for intracellular delivery of certain classes of therapeutic agents involves using transport agents that contain basic region of the HIV-TAT protein for intracellular delivery of certain classes of compounds. See, for example, U. S. Patent Nos. 5,652,122; 5,670, 617; 5,674, 980; 5,747,641; 5,804,604; and 6,316,003. Additionally, it has been reported that purified human immunodeficiency virus type-1 ("HIV") TAT protein is taken up from the surrounding medium by human cells growing in culture (A. D. Frankel and C. O. Pabo, "Cellular Uptake of the TAT Protein from Human Immunodeficiency Virus", *Cell*, 55, pp. 1189-93 (1988)). Generally, the TAT protein trans-activates certain HIV genes and is essential for viral replication. The full-length HIV-1 TAT protein has 86 amino acid residues. The HIV TAT gene has two exons. TAT amino acids 1-72 are encoded by exon 1, and amino acids 73-86 are encoded by exon 2. The full-length TAT protein is characterized by a basic region which contains two lysines and six arginines (amino acids 49-57) and a cysteine-rich region that contains seven cysteine residues (amino acids 22-37). In particular, the basic region (i.e., amino acids 49-57) is thought to be important for nuclear localization. (Ruben, S. et al., *J. Virol.* 63: 1-8 (1989); Hauber, J. et al., *J. Virol.* 63 1181-1187 (1989).

SUMMARY OF THE INVENTION

[0011] Whereas the basic region of HIV-TAT has been previously used to increase intracellular delivery of certain classes of molecules, this invention is based on the unexpected finding that the reverse sequence of the basic region of HIV-TAT can be used to increase transmembrane or intracellular delivery of cargo molecule, as defined herein. As a result of this finding, this invention provides novel transport molecules that are capable of increasing the transmembrane or intracellular penetration of cargo molecules. Thus, the transport molecules of present invention can be used to deliver a cargo molecule across membrane (e.g., transdermally) or through a cell membrane into eukaryotic cells (e.g., into the cell nucleus or cytoplasm), either in vitro or in vivo. This invention further relates to covalently or non-covalently bound conjugates of a transport molecule and a cargo molecule.

[0012] Additionally, this invention provides a method of using the novel transport molecules of the invention to increase the transmembrane or intracellular penetration of cargo molecules. This method is particularly suited for cargo molecules that either (1) are not inherently capable of entering target cells, cell nuclei, or membranes, or (2) are not inherently capable of entering the target cells, cell nuclei, or membranes at a useful rate. In certain preferred embodiments, the transport molecules of the invention are useful for delivery of proteins or peptides, such as regulatory factors, enzymes, antibodies, drugs or toxins, as well as DNA or RNA, into the cell nucleus or across membranes. Particularly preferred cargo molecules include toxins, non-limiting examples of which include botulinum, waglerin, and tetanus toxins. Intracellular delivery of cargo molecules according to this invention is accomplished by administration of conjugates of the novel transport molecules and cargo molecules to the cells of interest. In other embodiments, the invention provides methods of delivery of cargo molecules across membranes, by administering a transport molecule/cargo molecule conjugate to the membranes of interest. In one particularly preferred embodiment, the transport molecule/cargo molecule conjugate is topically administered to provide for transdermal penetration of the cargo molecule of interest.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1: *In vitro* percutaneous penetration of ¹²⁵I-associated radioactivity in human skin with K15RT2, fifteen (15) lysine with a polypeptide corresponding to SEQ ID NO. 1 attached to either end via a G spacer.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Formation of the transport molecules

[0013] The preferred transport molecules of this invention are characterized by the presence of a polypeptide having a sequence that corresponds to the reverse sequence of the HIV-TAT basic region amino acid sequence (amino acids 49-57 of naturally-occurring HIV-TAT protein). This reverse sequence of the HIV-TAT basic region, which is RRRQRRKKR (SEQ ID NO. 1) is hereafter referred to as the "reverse-

sequence polypeptide", and may be covalently or non-covalently attached to a cargo molecule of interest to form a conjugate. In certain embodiments, it is advantageous to covalently attach one or more reverse-sequence polypeptides to a cargo molecule of interest, either directly or via a peptide or polymeric linker. For example, the reverse-sequence polypeptide may be advantageously attached to cargo molecules by chemical cross-linking or by genetic fusion, as described herein.

[0014] Variants of the reverse-sequence polypeptide are also contemplated by this invention. Generally, any variant of the reverse-sequence polypeptide that can be used in a transport molecule to improve the transdermal or transmembrane penetration of a cargo molecule is considered a part of this invention. For example, in some embodiments, variants of the reverse-sequence polypeptide are produced by the deletion and/or substitution of at least one amino acid present in the reverse-sequence polypeptide to produce a modified reverse-sequence polypeptide. Modified reverse-sequence polypeptides can thus be produced that have amino acid sequences that are substantially similar, although not identical, to that of the reverse-sequence polypeptide. Preferred modified reverse-sequence polypeptides include those that are functional equivalent, or functionally equivalent peptide fragments thereof. Such functional equivalents or functionally equivalent fragments possess transmembrane and intracellular penetration ability that is substantially similar to that of naturally-occurring reverse-sequence polypeptide.

[0015] Reverse-sequence polypeptides or variants thereof can be obtained using a variety of methods, including genetic engineering techniques or chemical synthesis. In certain preferred embodiments, one or more substitutions may be made to modulate the penetration abilities of the reverse-sequence polypeptide, such that the resulting transport molecule tends to localize in certain areas, such as the cytoplasm of a target cell. Similar behavior has been previously observed for the basic region of naturally occurring HIV-TAT, and has been used to localize or to partially localize the HIV-TAT fragment in the cytoplasm (see e.g., Dang, C. V. and Lee, W. M. F., J. Biol. Chem. 264: 18019-18023 (1989); Hauber, J. et al., J. Virol. 63: 1181-1187 (1989); Ruben, S. A. et al., J. Virol. 63: 1-8 (1989)). Alternatively, a sequence for binding a cytoplasmic component can be attached to the reverse-sequence polypeptide in order to retain the reverse-sequence

12

polypeptide and the cargo molecule in the cytoplasm or to regulate nuclear uptake of a cargo molecule. In other embodiments, cholesterol or other lipid derivatives can be added to the reverse-sequence polypeptide or a variant thereof to increase the membrane solubility of the transport molecule. Of course, delivery of a given cargo molecule to the cytoplasm may be followed by further delivery of the same cargo molecule to the nucleus. Nuclear delivery necessarily involves traversing some portion of the cytoplasm.

[0016] While the reverse-sequence polypeptide is useful for providing transmembrane or intracellular delivery of cargo molecules, the transport molecules contemplated by this invention may also contain any other portion of the HIV-TAT native protein that enhances transmembrane or intracellular transport. For example, if desired, the transport molecules may also contain all 86 residues of the full HIV-TAT polypeptide having the sequence of a region of the native HIV-TAT protein that increase sequence of any portion thereof which demonstrates increasing uptake activating, non-limiting examples of which include residues 1-58, 37-72, or 49-57. However, in preferred embodiments, the transport molecule does not contain the cysteine-rich region of HIV-TAT, which corresponds to amino acids 22-37 of the native HIV-TAT sequence, and in which 7 out of 16 amino acids are cysteine. Those cysteine residues are capable of forming disulfide bonds with each other, with cysteine residues in the cysteine-rich region of other HIV-TAT protein molecules or fragments thereof that may be present, and with cysteine residues that may exist in a protein or polypeptide that constitutes the cargo molecule of interest. Such disulfide bond formation can cause loss of the biological activity of the cargo molecule. Furthermore, even if there is no potential for disulfide bonding to the cargo molecule (for example, when the therapeutic agent is a protein without cysteine residues), disulfide bond formation between transport molecules leads to aggregation and insolubility of the transport molecule, the transport molecule-cargo molecule conjugate, or both. Thus, the cysteine-rich region of the native HIV-TAT protein is potentially a source of serious problems in the use of HIV-TAT related proteins for delivery of therapeutic or diagnostic agents. By virtue of the absence of the cysteine-rich region present in HIV-TAT proteins, the preferred transport molecules of this invention avoid the problem of disulfide aggregation, which can result in loss of the biological activity or insolubility of the covalent or non-covalent conjugate of the

transport polypeptide/therapeutic agent, or both. Moreover, the reduced size of the preferred transport molecules of this invention also advantageously minimizes interference with the biological activity of the therapeutic or diagnostic agent. A further advantage of the reduced transport molecule size is enhanced uptake efficiency in embodiments of this invention involving attachment of multiple reverse-sequence polypeptides per cargo molecule.

[0017] Furthermore, this invention also contemplates transport molecules that contain one or more reverse-sequence polypeptides in conjunction with TAT proteins from other viruses, non-limiting examples of which include HIV-2 (M. Guyader et al., "Genome Organization and Transactivation of the Human Immunodeficiency Virus Type 2", *Nature*, 326, pp. 662-669 (1987)), equine infectious anemia virus (R. Carroll et al., "Identification of Lentivirus TAT Functional Domains Through Generation of Equine Infectious Anemia Virus/Human Immunodeficiency Virus Type 1 TAT Gene Chimeras", *J. Virol.*, 65, pp. 3460-67 (1991)), and simian immunodeficiency virus (L. Chakrabarti et al., "Sequence of Simian Immunodeficiency Virus from Macaque and Its Relationship to Other Human and Simian Retroviruses", *Nature*, 328, pp. 543-47 (1987); S. K. Arya et al., "New Human and Simian HIV-Related Retroviruses Possess Functional Transactivator (*tat*) Gene", *Nature*, 328, pp. 548-550 (1987)). It should be understood that transport molecules that comprise the reverse-sequence polypeptide and any polypeptide derived from these other TAT proteins fall within the scope of the present invention, including those characterized by the presence of the TAT basic region and the absence of the TAT cysteine-rich region.

[0018] The transport molecules of this invention may be chemically synthesized or produced by recombinant DNA methods when the transport molecules are polypeptides. Methods for chemical synthesis or recombinant DNA production of polypeptides having a known amino acid sequence are well known. Automated equipment for polypeptide or DNA synthesis is commercially available. Host cells, cloning vectors, DNA expression control sequences and oligonucleotide linkers are also commercially available for preparing polypeptide transport molecules.

[0019] According to the invention, a cargo molecule is combined, either covalently or non-covalently, with a transport molecule to form a conjugate. In preferred embodiments, the cargo molecules contemplated by the invention include any substance that has prophylactic, therapeutic, or diagnostic application. However, any biologically active agent is also contemplated by this invention, including cargo molecules that can have an adverse affect on the recipient, such as a toxin that is useful for euthanizing animals. Wide latitude exists in the selection of cargo molecules for use in the practice of this invention. Non-limiting examples of cargo molecules contemplated by this invention include drugs, diagnostic agents, enzymes, proteins, polypeptides, oligonucleotides, antigens, and toxins. Cargo molecules contemplated by the invention can be obtained or produced using known techniques, such as chemical synthesis, genetic engineering methods, or isolation from sources in which it occurs naturally.

[0020] In one preferred embodiment, the cargo molecule is a toxin molecule derived from a serotype of botulinum toxin. Particularly preferred are toxins directly isolated from botulinum serotypes A, B, C, D, E, F, and G, although modified forms of these botulinum serotypes are also expressly considered to be a part of this invention. Such modified forms include, without limitation, toxin molecules in which contain additions or deletions of amino acid residues, provided that those additions or deletions do not substantially alter the biological effect of the toxin molecule. In other embodiments, the cargo molecule is an antigen and the conjugation to the transport molecule is for the purpose of making a vaccine. For example, the cargo molecule can be an antigen from the bacteria or virus or other infectious agent that the vaccine is to immunize against (e.g., gp120 of HIV). Providing the antigen into the cell cytoplasm allows the cell to process the molecule and express it on the cell surface. Expression of the antigen on the cell surface will raise a killer T-lymphocyte response, thereby inducing immunity.

[0021] In yet another embodiment of the invention, the cargo molecule is a protein, such as an enzyme, antibody, toxin, or regulatory factor (e.g., transcription factor) whose delivery into cells, and particularly into the cell nucleus is desired. For example, some viral oncogenes inappropriately turn on expression of cellular genes by

13

binding to their promoters. By providing a competing binding protein in the cell nucleus, viral oncogene-activity can be inhibited.

[0022] In a further embodiment, the cargo molecule is a nucleotide sequence to be used as a diagnostic tool (or probe), or as a therapeutic agent, such as an oligonucleotide sequence that is complementary to a target cellular gene or gene region and capable of inhibiting activity of the cellular gene or gene region by hybridizing with it. The rate at which single-stranded and double-stranded nucleic acids enter cells, in vitro and in vivo, may be advantageously enhanced, using the transport molecules of this invention. For example, methods for chemical cross-linking of polypeptides to nucleic acids are well known in the art. In a preferred embodiment of this invention, the cargo molecule is a single-stranded antisense nucleic acid. Antisense nucleic acids are useful for inhibiting cellular expression of sequences to which they are complementary. In another embodiment of this invention, the cargo molecule is a double-stranded nucleic acid comprising a binding site recognized by a nucleic acid-binding protein. An example of such a nucleic acid-binding protein is a viral trans-activator.

[0023] The cargo molecule of interest may also be a drug, such as a peptide analog or small molecule enzyme inhibitor, whose introduction specifically and reliably into a cell nucleus is desired.

[0024] The cargo molecules of this invention may also be diagnostic agents that provide information, in vitro or in vivo, about the local environment where the cargo molecules are present. Factors to be considered in selecting diagnostic agents include, but are not limited to, the type of experimental information sought, the condition being diagnosed or imaged, the route of administration, non-toxicity, convenience of detection, quantifiability of detection, and availability. Many such diagnostic agents are known to those skilled in the art. Non-limiting examples of suitable diagnostic agents include radiopaque contrast agents, paramagnetic contrast agents, superparamagnetic contrast agents, CT contrast agents and other contrast agents. For example, radiopaque contrast agents (for X-ray imaging) will include inorganic and organic iodine compounds (e.g., diatrizoate), radiopaque metals and their salts (e.g., silver, gold, platinum and the like) and other radiopaque compounds (e.g., calcium salts, barium salts such as barium sulfate,

10

tantalum and tantalum oxide). Suitable paramagnetic contrast agents (for MR imaging) include gadolinium diethylene triaminepentaacetic acid (Gd-DTPA) and its derivatives, and other gadolinium, manganese, iron, dysprosium, copper, europium, erbium, chromium, nickel and cobalt complexes, including complexes with 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N''-triacetic acid (DO3A), 1,4,7-triazacyclononane-N,N',N''-triacetic acid (NOTA), 1,4,8,10-tetraazacyclotetradecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (TETA), hydroxybenzylethylene-diamine diacetic acid (HBED) and the like. Suitable superparamagnetic contrast agents (for MR imaging) include magnetites, superparamagnetic iron oxides, monocrystalline iron oxides, particularly complexed forms of each of these agents that can be covalently or non-covalently attached to a reverse-sequence polypeptide or a positively charged backbone that contains a reverse-sequence polypeptide, as described herein. Still other suitable imaging agents are the CT contrast agents including iodinated and noniodinated and ionic and nonionic CT contrast agents, as well as contrast agents such as spin-labels or other diagnostically effective agents.

[0025] Other examples of diagnostic agents include marker genes that encode proteins that are readily detectable when expressed in a cell, including, but not limited to, β -galactosidase, green fluorescent protein, blue fluorescent protein, luciferase, and the like. A wide variety of labels may be employed, such as radionuclides, fluorophores, enzymes, enzyme substrates, enzyme cofactors, enzyme inhibitors, ligands (particularly haptens), and the like. Still other useful substances are those labeled with radioactive species or components, such as ^{99m}Tc glucoheptonate.

[0026] The attachment of the cargo molecule to the transport molecule may be effected by any means that produces a link between the two constituents which is sufficiently stable to withstand the conditions used and which does not alter the function of either constituent. The link between them may be non-covalent or covalent. For example, recombinant techniques can be used to covalently attach transporter molecules that are polypeptides to protein/polypeptide-based cargo molecules, by joining the gene coding for the cargo molecule with the gene coding for the polypeptide transporter

27

molecule and then introducing the resulting gene construct into a cell capable of expressing the conjugate. Alternatively, the two separate nucleotide sequences can be expressed in a cell or can be synthesized chemically and subsequently joined covalently, using known techniques. Also, the protein/peptide-based cargo molecule conjugate with the transporter molecule can be synthesized chemically as a single amino acid sequence (i.e., one in which both constituents are present) and, thus, joining is not needed.

[0027] Numerous chemical cross-linking methods are known and potentially applicable for conjugating the transport polypeptides of this invention to cargo molecules that are macromolecules. Many known chemical cross-linking methods are non-specific, i.e., they do not direct the point of coupling to any particular site on the transport polypeptide or cargo macromolecule. As a result, use of non-specific cross-linking agents may attack functional sites or sterically block active sites, rendering the conjugated proteins biologically inactive.

[0028] A preferred approach to increasing coupling specificity in the practice of this invention is direct chemical coupling to a functional group found only once or a few times in one or both of the polypeptides to be cross-linked. For example, in many proteins, cysteine, which is the only protein amino acid containing a thiol group, occurs only a few times. Also, for example, if a polypeptide contains no lysine residues, a cross-linking reagent specific for primary amines will be selective for the amino terminus of that polypeptide. Successful utilization of this approach to increase coupling specificity requires that the polypeptide have the suitably rare and reactive residues in areas of the molecule that may be altered without loss of the molecule's biological activity.

[0029] Cysteine residues may be replaced when they occur in parts of a polypeptide sequence where their participation in a cross-linking reaction would likely interfere with biological activity. When a cysteine residue is replaced, it is typically desirable to minimize resulting changes in polypeptide folding. Changes in polypeptide folding are minimized when the replacement is chemically and sterically similar to cysteine. For these reasons, serine is preferred as a replacement for cysteine. A cysteine residue may be introduced into a polypeptide's amino acid sequence for cross-linking purposes. When a cysteine residue is introduced, introduction at or near the amino or

18

carboxy terminus is preferred. Conventional methods are available for such amino acid sequence modifications, whether the polypeptide of interest is produced by chemical synthesis or expression of recombinant DNA.

[0030] Coupling of the two constituents can be accomplished via a coupling or conjugating agent. There are several intermolecular cross-linking reagents that can be utilized (see, for example, Means, G. E. and Feeney, R. E., *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day, 1974, pp. 39-43). Among these reagents are, for example, J-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) or N, N'-(1,3-phenylene) bismaleimide (both of which are highly specific for sulfhydryl groups and form irreversible linkages); N, N'-ethylene-bis-(iodoacetamide) or other such reagent having 6 to 11 carbon methylene bridges (which are relatively specific for sulfhydryl groups); and 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene (which forms irreversible linkages with amino and tyrosine groups). Other cross-linking reagents useful for this purpose include: p,p'-difluoro-m,m'-dinitrodiphenylsulfone (which forms irreversible cross-linkages with amino and phenolic groups); dimethyl adipimidate (which is specific for amino groups); phenol-1,4-disulfonylchloride (which reacts principally with amino groups); hexamethylenediisocyanate or diisothiocyanate, or azophenyl-p-diisocyanate (which reacts principally with amino groups); glutaraldehyde (which reacts with several different side chains) and disdiazobenzidine (which reacts primarily with tyrosine and histidine).

[0031] Cross-linking reagents may be homobifunctional, i.e., having two functional groups that undergo the same reaction. A preferred homobifunctional cross-linking reagent is bismaleimido-hexane ("BMH"). BMH contains two maleimide functional groups, which react specifically with sulfhydryl-containing compounds under mild conditions (pH 6.5-7.7). The two maleimide groups are connected by a hydrocarbon chain. Therefore, BMH is useful for irreversible cross-linking of polypeptides that contain cysteine residues.

[0032] Cross-linking reagents may also be heterobifunctional. Heterobifunctional cross-linking agents have two different functional groups, for example an amine-reactive group and a thiol-reactive group, that will cross-link two proteins having free amines and thiols, respectively. Examples of heterobifunctional cross-linking agents are succinimidyl

19

4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate ("SMCC"), m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester ("MBS"), and succinimide 4-(p-maleimidophenyl)butyrate ("SMPB"), an extended chain analog of MBS. The succinimidyl group of these cross-linkers reacts with a primary amine, and the thiol-reactive maleimide forms a covalent bond with the thiol of a cysteine residue.

[0033] Cross-linking reagents often have low solubility in water. A hydrophilic moiety, such as a sulfonate group, may be added to the cross-linking reagent to improve its water solubility. Sulfo-MBS and sulfo-SMCC are examples of cross-linking reagents modified for water solubility.

[0034] Many cross-linking reagents yield a conjugate that is essentially non-cleavable under cellular conditions. However, some cross-linking reagents contain a covalent bond, such as a disulfide, that is cleavable under cellular conditions. For example, dithiobis(succinimidylpropionate) ("DSP"); Traut's reagent and N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate ("SPDP") are well-known cleavable cross-linkers. The use of a cleavable cross-linking reagent permits the cargo moiety to separate from the transport polypeptide after delivery into the target cell. Direct disulfide linkage may also be useful.

[0035] Some new cross-linking reagents such as n-γ-maleimidobutyryloxy-succinimide ester ("GMBS") and sulfo-GMBS, have reduced immunogenicity. In some embodiments of the present invention, such reduced immunogenicity may be advantageous.

[0036] Numerous cross-linking reagents, including the ones discussed above, are commercially available. Detailed instructions for their use are readily available from the commercial suppliers. A general reference on protein cross-linking and conjugate preparation is: S. S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press (1991).

[0037] Chemical cross-linking may include the use of spacer arms. Spacer arms provide intramolecular flexibility or adjust intramolecular distances between conjugated moieties and thereby may help preserve biological activity. A spacer arm may be in the form of a polypeptide moiety comprising spacer amino acids. In one particular

embodiment, the spacer linker is composed of one or more glycine units, such as a GG dimer, for example. Alternatively, a spacer arm may be part of the cross-linking reagent, such as in "long-chain SPDP" (Pierce Chem. Co., Rockford, Ill., cat. No. 21651 H).

[0038] It will be recognized by those of ordinary skill in the art that when the transport polypeptide is genetically fused to the cargo moiety, it is advantageous to add an amino-terminal methionine, but spacer amino acids (e.g., CysGlyGly or GlyGlyCys) need not be added in some embodiments. A unique terminal cysteine residue is a preferred means of chemical cross-linking. According to some preferred embodiments of this invention, the carboxy terminus of the reverse-sequence polypeptide is genetically fused to the amino terminus of a cargo molecule that includes a polypeptide or protein.

[0039] In certain preferred embodiments, the reverse-sequence polypeptide is itself a transport molecule that non-covalently associates with a cargo molecule to form a non-covalent conjugate that enhances delivery of the cargo molecule. Alternatively, the reverse-sequence polypeptide is covalently attached, not to the cargo molecule, but instead to a backbone molecule (either directly or via a linker) to form a transport molecule that non-covalently associates with the cargo molecule to form a conjugate. In a particularly preferred embodiment, the transport molecule includes one or more copies of the reverse-sequence polypeptide, covalently attached to a positively-charged backbone. Optionally, other transport-enhancing fragments of native HIV-TAT or of TAT proteins from other viruses may be attached to the positively charged backbone as well. A positively-charged backbone is typically a linear chain of atoms, either with groups in the chain carrying a positive charge at physiological pH, or with groups carrying a positive charge attached to side chains extending from the backbone. The linear backbone is a hydrocarbon backbone, which is, in some embodiments, interrupted by heteroatoms selected from nitrogen, oxygen, sulfur, silicon and phosphorus. The majority of backbone chain atoms are usually carbon. Additionally, the backbone will often be a polymer of repeating units (e.g., amino acids, poly(ethyleneoxy), poly(propyleneamine), and the like). In one group of embodiments, the positively charged backbone is a polypropyleneamine wherein a number of the amine nitrogen atoms are present as ammonium groups (tetra-substituted) carrying a positive charge. In another group of embodiments, the backbone has attached a plurality of sidechain

moieties that include positively charged groups (e.g., ammonium groups, pyridinium groups, phosphonium groups, sulfonium groups, guanidinium groups, or amidinium groups). The sidechain moieties in this group of embodiments can be placed at spacings along the backbone that are consistent in separations or variable. Additionally, the length of the sidechains can be similar or dissimilar. For example, in one group of embodiments, the sidechains can be linear or branched hydrocarbon chains having from one to twenty carbon atoms and terminating at the distal end (away from the backbone) in one of the above-noted positively charged groups.

[0040] In one group of embodiments, the positively charged backbone is a polypeptide having multiple positively charged sidechain groups (e.g., lysine, arginine, ornithine, homoarginine, and the like). One of skill in the art will appreciate that when amino acids are used in this portion of the invention, the sidechains can have either the D- or L-form (R or S configuration) at the center of attachment.

[0041] Alternatively, the backbone can be an analog of a polypeptide such as a peptoid. See, for example, Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32:543 (1993); Zuckermann et al. *Chemtracts-Macromol. Chem.* 4:80 (1992); and Simon et al. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89:9367 (1992)). Briefly, a peptoid is a polyglycine in which the sidechain is attached to the backbone nitrogen atoms rather than the α -carbon atoms. As above, a portion of the sidechains will typically terminate in a positively charged group to provide a positively charged backbone component. Synthesis of peptoids is described in, for example, U.S. Pat. No. 5,877,278. As the term is used herein, positively charged backbones that have a peptoid backbone construction are considered "non-peptide" as they are not composed of amino acids having naturally occurring sidechains at the α -carbon locations.

[0042] A variety of other backbones can be used employing, for example, steric or electronic mimics of polypeptides wherein the amide linkages of the peptide are replaced with surrogates such as ester linkages, thioamides ($--CSNH--$), reversed thioamide ($--NHCS--$), aminomethylene ($--NHCH_2--$) or the reversed methyleneamino ($--CH_2NH--$) groups, keto-methylene ($--COCH_2--$) groups, phosphinate ($--PO_2RCH_2--$), phosphoramidate and phosphoramidate ester ($--PO_2RNH--$), reverse peptide

(--NHCO--), trans-alkene (--CR=CH--), fluoroalkene (--CF=CH--), dimethylene (--CH₂CH₂--), thioether (--CH₂S--), hydroxyethylene (--CH(OH)CH₂--), methyleneoxy (--CH₂O--), tetrazole (CN₄), sulfonamido (--SO₂NH--), methylenesulfonamido (--CHRSO₂NH--), reversed sulfonamide (--NHSO₂--), and backbones with malonate and/or gem-diamino-alkyl subunits, for example, as reviewed by Fletcher et al. ((1998) Chem. Rev. 98:763) and detailed by references cited therein. Many of the foregoing substitutions result in approximately isosteric polymer backbones relative to backbones formed from α -amino acids.

[0043] In another particularly preferred embodiment, the backbone portion is a polylysine and the reverse-sequence polypeptides are attached to the lysine sidechain amino groups. The polylysine used in this particularly preferred embodiment can be any of the commercially available (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., USA) polylysines such as, for example, polylysine having MW>70,000, polylysine having MW of 70,000 to 150,000, polylysine having MW 150,000 to 300,000 and polylysine having MW>300,000. The appropriate selection of a polylysine will depend on the remaining components of the composition and will be sufficient to provide an overall net positive charge to the composition.

Delivery of the Transport Molecule/Cargo molecule conjugate

[0044] This invention is generally applicable for therapeutic, prophylactic or diagnostic intracellular or transmembrane delivery of small molecules and macromolecules, such as proteins, nucleic acids and polysaccharides, that are not inherently capable of entering target cells or penetrating biological membranes at a useful rate. The processes and compositions of this invention may be applied to any organism, including humans. The processes and compositions of this invention may also be applied to animals and humans in utero. According to one preferred embodiment of this invention, a cargo molecule is delivered into the cells of various organs and tissues following introduction of a transport molecule-cargo conjugate into or onto a live human or animal. For example, the cargo molecule/transport molecule conjugate may be brought into contact with cells into which introduction of the cargo molecule is desired.

As a result, the conjugate enters into cells, passing into the nucleus. In another embodiment, the cargo molecule/transport molecule conjugate is administered to a surface of a membrane to cause transmembrane penetration of the cargo molecule/transport molecule conjugate. For example, the cargo molecule/transport molecule conjugate may be administered topically to a region that would benefit from the therapeutic action of the cargo molecule. In a particularly preferred embodiment, the cargo molecule is a serotype of botulinum toxin, and the cargo molecule/transport molecule conjugate is topically administered in regions of the skin having furrows or wrinkles, in order to reduce the appearance of the furrows or wrinkles.

[0045] Alternatively, the cargo molecule/transporter molecule conjugate can be delivered in vivo by cells that are produced and implanted into an individual. The cells are genetically engineered so that they express the cargo molecule/transport molecule conjugate continuously in vivo.

[0046] Alternatively, the present invention may be used to deliver a cargo molecule in vitro. For example, in in vitro applications in which the cargo molecule is to be delivered into cells in culture, the cargo molecule/transport molecule conjugate can be simply added to the culture medium. This is useful, for example, as a means of delivering into the nucleus substances whose effect on cell function is to be assessed. For example, the activity of purified transcription factors can be measured, or the in vitro assay can be used to provide an important test of a cargo molecule's activity, prior to its use in in vivo treatment.

[0047] Delivery can also be carried out in vitro by producing cells that synthesize the desired cargo molecule/transport molecule conjugate in vitro or by combining a sample (e.g., blood, bone marrow) obtained from an individual with the cargo molecule/transport conjugate, under appropriate conditions. For example, a selected cargo molecule in combination with TAT protein or the cargo molecule of interest-TAT protein conjugate can be combined with a sample obtained from an individual (e.g., blood, bone marrow) in order to introduce the molecule of interest into cells present in the sample and, after treatment in this manner, the sample returned to the individual. A series of treatments carried out in this manner can be used to prevent or inhibit the effects

of an infectious agent. For example, blood can be removed from an individual infected with HIV or other viruses, or from an individual with a genetic defect. The blood can then be combined with the cargo molecule/transport molecule conjugate in which the cargo molecule of interest is a drug capable of inactivating the virus, or an oligonucleotide sequence capable of hybridizing to a selected virus sequence and inactivating, it or a protein that supplements a missing or defective protein, under conditions appropriate for entry in cells of the conjugate and maintenance of the sample in such a condition that it can be returned to the individual. After treatment, the blood is returned to the individual.

[0048] Delivery can be carried out in vivo by administering the cargo molecule/transport molecule conjugate to an individual in whom it is to be used for diagnostic, preventative or therapeutic purposes. The target cells may be in vivo cells, i.e., cells composing the organs or tissues of living animals or humans, or microorganisms found in living animals or humans.

[0049] In some embodiments, the transport molecule/cargo molecule conjugate is combined with an agent that increases stability and penetration. For example, metal ions that bind to HIV-TAT protein and increase its stability and penetration, can be used for this purpose. Alternatively, a lysosomotropic agent is provided extracellularly in conjunction with the transport molecule and cargo molecule in order to enhance uptake by cells. The lysosomotropic agent can be used alone or in conjunction with a stabilizer. For example, lysosomotropic agents such as chloroquine, monensin, amantadine and methylamine, which have been shown to increase uptake of naturally-occurring HIV-TAT in some cells by a few hundred fold, can be used for this purpose.

[0050] In another embodiment, a basic peptide, such as a peptide sequence that corresponds to residues 38-58 of HIV-TAT or protamine, is provided extracellularly with the transport molecule and cargo molecule to enhance the uptake of the cargo molecule. Such basic peptides can also be used alone, or in combination with stabilizing agents or lysosomotropic agents.

[0051] The pharmaceutical compositions of this invention may be for therapeutic, prophylactic or diagnostic applications, and may be in a variety of forms. These include,

for example, solid, semi-solid, and liquid dosage forms, such as tablets, pills, powders, liquid solutions or suspensions, aerosols, liposomes, suppositories, injectable and infusible solutions and sustained release forms. The preferred form depends on the intended mode of administration and the therapeutic, prophylactic or diagnostic application. According to this invention, a selected cargo molecule/transport molecule conjugate may be administered by conventional routes of administration, such as parenteral, subcutaneous, intravenous, intramuscular, intralesional, intrasternal, intracranial or aerosol routes. Topical routes of administration may also be used, with application of the compositions locally to a particular part of the body (e.g., skin, lower intestinal tract, vagina, rectum) where appropriate. The compositions also preferably include conventional pharmaceutically acceptable carriers and adjuvants that are known to those of skill in the art.

[0052] Generally, the pharmaceutical compositions of the present invention may be formulated and administered using methods and compositions similar to those used for pharmaceutically important polypeptides such as, for example, alpha interferon. It will be understood that conventional doses will vary depending upon the particular cargo molecule involved, as well as the patient's health, weight, age, sex, the condition or disease and the desired mode of administration. The pharmaceutical compositions of this invention include pharmacologically appropriate carriers, adjuvants and vehicles. In general, these carriers include aqueous or alcoholic/aqueous solutions, emulsions or suspensions, including saline and buffered media. Parenteral vehicles can include sodium chloride solution, Ringer's dextrose, dextrose and sodium chloride, lactated Ringer's or fixed oils. In addition, intravenous vehicles can include fluid and nutrient replenishers, and electrolyte replenishers, such as those based on Ringer's dextrose. Preservatives and other additives can also be present, such as, for example, antimicrobials, antioxidants, chelating agents, and inert gases. See, generally, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mack, ed. 1980.

[0053] It should be appreciated, however, that alternate embodiments of this invention are not limited to clinical applications. This invention may be advantageously applied in medical and biological research. In research applications of this invention, the cargo molecule may be a drug or a diagnostic agent. Transport molecules of this

invention may be used as research laboratory reagents, either alone or as part of a transport molecule conjugation kit.

[0054] While we have described a number of embodiments of this invention, it is apparent that our basic constructions can be altered to provide other embodiments that utilize the processes and products of this invention. Therefore, it will be appreciated that the scope of this invention is to be defined by the appended claims rather than by the specific embodiments that have been presented by way of example.

Example 1

[0055] The objective of the present study was to evaluate the possibility of delivering a large cargo molecule (botulinum toxin type A) to human skin *in vitro* using flow-through diffusion cells. Since the toxin is of considerable size, the dermal uptake without use of any transport molecule was expected to be negligibly low. Therefore, a carrier solution was added at different toxin/carrier ratios in an attempt to increase/facilitate dermal uptake through the stratum corneum layer. In addition to the amount present in the receptor fluid at various time points, the distribution in the various skin layers was evaluated after 24 hours. The complete Neuronox® product (i.e. the toxin/albumin complex including accessory proteins) were radio-labelled using ¹²⁵I.

1.1 Test system

[0056] Preparation of skin membranes: Human skin membranes were prepared from frozen skin sample (a single donor directly after abdominal surgery). After thawing, the skin was dermatomed using a Dermatome 25 mm (Nouvag GmbH, Germany) to a recorded thickness of approximately 400 µm.

[0057] Flow-through diffusion cells: The skin membranes were placed in 9 mm flow-through automated diffusion cells (PermeGear Inc., Riegelsville, PA, USA). The skin surface temperature was kept at approximately 32 °C, at ambient humidity. The receptor fluid was pumped at a speed of about 1.6 mL h⁻¹ and consisted of Phosphate Buffered Saline (PBS) containing 0.01 % sodium azide (w/v).

1.2 Experimental design and procedures

[0058] ¹²⁵I-labelling of the test substances: The contents of one vial containing the Neuronox product was reconstituted in 100 µL 50 mM KH₂PO₄ buffer, pH 7.2. During iodination 37 MBq Na¹²⁵I (10 µl) , 20 µl of an approximatley 100,000-fold diluted hydrogen peroxide solution in water (30 % (v/v) perhydrol) and 20 µl lactoperoxidase. (4 µg.10 µL-1 water) was added to the vial containing the Neuronox® product. After about 60 seconds, iodination was stopped by the addition of 50 µL tyrosine solution (1 mg mL-1) in phosphate buffer to remove excess ¹²⁵I that had not yet reacted with the available proteins (toxin, albumin etc.). After one minute, ¹²⁵I (bound to L-tyrosine) was separated from the radio-labelled proteins by using a Sephadex G25 fine column of about 10 mL volume equilibrated with assay buffer containing 0.5 % (w/v) BSA. Fractions of about 250 µL were collected. Sub-fractions were taken for radio-activity measurement. Fractions were stored at 2-10 °C until further use.

[0059] Experimental design: The Neuronox® product was evaluated for its ability to penetrate the skin in K15RT2 carrier solutions. Prior to application of the test compound, the skin integrity was assessed by determining the permeability coefficient (Kp) of tritiated water. The experimental set up was as follows:

Group	n	Carrier/toxin ratio	Test substance
A	4	control (no carrier)	NNX alone
B	5	1:1	K15TR2 + NNX

[0060] Recovery procedure: After 24 hours, the unabsorbed test substance (dislodgeable dose) was removed from the application site using a mild soap solution (3 % Teepol in water) and cotton swabs. The skin surface was dried after washing using dry cotton swabs. The receptor compartment and the donor compartment were rinsed with water (2 times 1 mL). Subsequently, each skin membrane was tape stripped (10 times per

membrane) using D-squame (Monaderm, Monaco). Tape stripping was discontinued in case the epidermis was ruptured. Tape strips containing (pieces of) the epidermis were pooled with the skin membrane (epidermis). Finally, the epidermis and dermis were separated mechanically using a scalpel knife and tweezers. Radioactivity in all fractions was measured by γ -radiation counting.

1.3 Analysis

[0061] **Determination of radioactivity:** Radioactivity in the samples of the integrity test was determined by liquid scintillation counting (LSC) using DOT-DPMTM (digital overlay technique using the spectrum library and the external standard spectrum) for quench correction on a Wallac Pharmacia model S1414 scintillation counter. Calibration procedures for the instruments are established at the testing facilities.

[0062] **Dose formulations:** Aliquots of the dose formulation taken just before and directly after dosing were added directly to liquid scintillant (Ultima GoldTM) and measured by LSC. **Receptor fluid** Samples of the receptor fluid were added directly to a liquid scintillant (Ultima GoldTM) and measured by LSC. Radioactivity in the samples of the absorption test using ¹²⁵I-labelled test compound were determined using a Gamma Counter (Perkin Elmer).

1.4 Calculations

[0063] The total absorption is defined as the amount of compound-related radioactivity present in the receptor fluid, the receptor compartment wash, and the skin (excluding tape strips)

2. Results

[0064] Percutaneous absorption of the test item

[0065] The percutaneous absorption of [¹²⁵I]Neuronox®, was evaluated on human skin membranes. The exposure time was 24 hours. The (tissue) distribution is presented in table 1.

Table 1: Overview table of the *in vitro* percutaneous penetration of ¹²⁵I-associated radioactivity in human skin (expressed as percentage of the applied dose)

Group	A		B	
	mean	sd	mean	sd
Skin wash	111.15	2.10	101.44	3.51
Charcoal filter	0.01	0.00	0.01	0.00
Stratum Cornea	0.76	0.59	2.43	1.43
Epidermis	0.28	0.09	0.30	0.09
Dermis	0.27	0.41	1.03	0.77
Receptor fluid	0.43	0.38	0.93	0.72
Total recovery	112.94	1.14	106.28	1.52

[0066] FIG. 1 shows the *in vitro* percutaneous penetration of ¹²⁵I-associated radioactivity in human skin with K15RT2. The data clearly show that the *in vitro* percutaneous penetration of ¹²⁵I-associated radioactivity is much higher with botulinum toxin plus K15RT2, as compared to botulinum toxin alone.

We claim:

1. A transport molecule for the delivery of a cargo molecule, wherein said transport molecule comprises a reverse-sequence polypeptide having an amino acid sequence according to SEQ ID NO 1.
2. The transport molecule according to claim 1, wherein the reverse-sequence polypeptide is covalently attached to the cargo molecule.
3. The transport molecule according to claim 1, wherein the reverse-sequence polypeptide is covalently bound to a positively-charged backbone that is non-covalently attached to the cargo molecule.
4. The transport molecule according to claim 3, wherein the reverse-sequence polypeptide is covalently bound to a positively charged backbone that is non-covalently bound to the cargo molecule.
5. The transport molecule according to claim 1, wherein said transport molecule increases the penetration of the cargo molecule through a biological membrane.
6. The transport molecule according to claim 5, wherein the biological membrane is found in the skin.
7. The transport molecule of claim 1, wherein said transport molecule increases the intracellular penetration of the cargo molecule.
8. A conjugate for the delivery of a cargo molecule, said conjugate comprising
a transport molecule comprising a reverse-sequence polypeptide having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO. 1; and
a cargo molecule.

9. The conjugate according to claim 8, wherein said transport molecule is covalently attached to said cargo molecule.
10. The conjugate according to claim 8, wherein said transport molecule is non-covalently attached to said cargo molecule.
11. The conjugate according to claim 8, wherein said cargo molecule is a therapeutic agent.
12. The conjugate according to claim 11, wherein said therapeutic agent is selected from the group consisting of peptides, proteins, oligonucleotides, enzymes, and antigens.
13. The conjugate according to claim 11, wherein said therapeutic agent derived from a serotype of botulinum toxin or a fragment thereof.
14. The conjugate according to claim 13, wherein said diagnostic agent is selected from the group consisting of radiopaque contrast agents, paramagnetic contrast agents, superparamagnetic contrast agents, and CT contrast agents.
15. A method for the treatment of a disease, wherein said method comprises
 - selecting a cargo molecule;
 - selecting a transport molecule;
 - binding said cargo molecule to said transport molecule either covalently or non-covalently to form a cargo molecule/transport molecule conjugate; and
 - administering said conjugate to target cells or to a membrane in order to cause intracellular or transmembrane delivery of the cargo molecule.

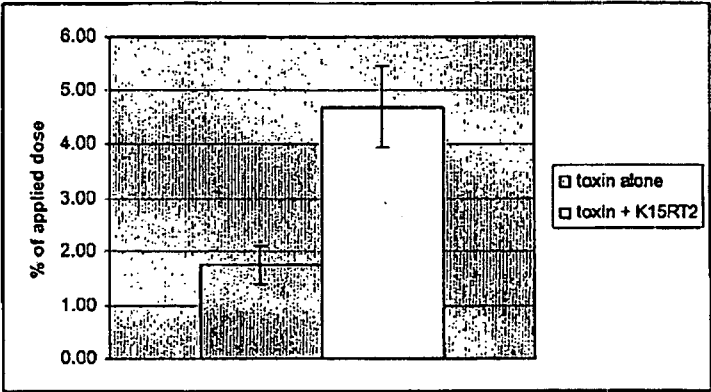


FIGURE 1

SEQUENCE LISTING

<110> Waugh, Jacob M.
Lee, Jae Hoon

<120> Transport Molecules Using Reverse Sequence HIV-TAT Polypeptides

<130> 13720-105127

<140> US 11/954,885
<141> 2007-12-12

<150> US 60/882,639
<151> 2006-12-29

<160> 1

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus

<400> 1

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg
1 5

MOLÉCULAS DE TRANSPORTE QUE UTILIZAN POLIPÉPTIDOS HIV-TAT DE
SECUENCIA INVERSA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5

Esta solicitud reivindica la prioridad de Solicitud provisional Estadounidense Serie No. 60/882,639, presentada en Diciembre 29, 2006, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

10 CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

Esta invención se relaciona con moléculas de transporte novedosas que comprenden un polipéptido que tiene residuos de aminoácido dispuestos en una secuencia que es la secuencia inversa de la porción básica de la proteína HIV-
15 TAT. Las moléculas de transporte novedosas son útiles para el suministro intracelular o de transmembrana de las moléculas de carga, ejemplos no limitantes los cuales incluyen polipéptidos y ácidos nucleicos. Las moléculas de transporte
novedosas se pueden unir covalentemente o no covalentemente a las moléculas de carga. El tamaño reducido de la molécula de transporte preferida de esta
20 invención también minimiza la interferencia con la actividad biológica de la molécula de carga.

ANTECEDENTE DE LA INVENCION

25 El suministro de transmembrana o intracelular de agentes terapéuticos o de diagnóstico frecuentemente se complica por la incapacidad de tales agentes para alcanzar los tejidos o sitios intracelulares de interés. Esta complicación se puede

elevar, en parte, debido a que el organismo de membrana ha evolucionado para mantener afuera los compuestos externos como una forma de protección del organismo.

5 Considerando, por ejemplo, la estructura de complejo de la piel humana, que protege los órganos del cuerpo de amenazas ambientales externas y que actúa como un termostato para mantener la temperatura corporal. La piel consiste de varias capas diferentes, cada una con funciones especializadas. Las capas principales incluyen la hipodermis, la dermis y la epidermis. La hipodermis es la

10 capa más profunda de la piel. Esta actúa como un aislante para la conservación del calor corporal y como un absorbente de choques para la protección de los órganos (Inlander, Skin, New York, N. Y.: People's Medical Society, 1-7 (1998)). Adicionalmente, la hipodermis también almacena grasa para las reservas de energía. El pH de la piel está normalmente entre 5 y 6. Esta acidez se debe a la

15 presencia de aminoácidos anfotéricos, ácido láctico, y ácidos grasos de las secreciones de las glándulas sebáceas. El término "manto ácido" se refiere a la presencia de las sustancias solubles en agua en la mayoría de las regiones de la piel. La capacidad amortiguación de la piel se debe en parte a estas secreciones que se almacenan en la capa de queratina de la piel.

20

La dermis, que descansa por encima de la hipodermis, es de 1.5 a 4 milímetros de espesor. Esta es la más gruesa de las tres capas de la piel. Adicionalmente, la dermis también alberga la mayoría de las estructuras de la piel, que incluyen glándulas sudoríparas y sebáceas (que secretan sustancias a través de aberturas

25 en la piel llamadas poros, o comedones), folículos pilosos, terminaciones nerviosas, y vasos linfáticos o sanguíneos (Inlander, Skin, New York, N.Y.:

People's Medical Society, 1-7 (1998)). Sin embargo, los componentes principales de la dermis son tejidos conectivos tal como colágeno y elastina.

La epidermis es una capa estratificante de células epiteliales que descansa sobre la dermis y es la capa más superior de la piel. La epidermis es de solo 0.1 a 1.5 milímetros de espesor (Inlander, Skin, New York, N. Y.; People's Medical Society, 1-7 (1998)), consiste de queratinocitos, se divide en varias capas con base en su estado de diferenciación. La epidermis se puede clasificar adicionalmente en el estrato córneo y la epidermis viable, que consiste de células basales y melfigianas granulares.

Un problema significativo en la aplicación agentes fisiológicamente activos, transdérmicamente o tópicamente es que la piel es una barrera efectiva para penetración, la naturaleza aceitosa del estrato córneo y la compactación hermética de sus células proporciona una barrera efectiva contra agentes sólidos, líquidos o gaseosos, si se utilizan solos o en agua o en soluciones aceitosas. Así, el estrato córneo frustra los esfuerzos de aplicaciones de agentes diagnósticos, terapéuticos o cosméticos tópicamente a las áreas locales del cuerpo. Esto es problemático, debido a que muchos agentes fisiológicamente activos idealmente se deben aplicar tópicamente en un área localizada para alcanzar concentraciones locales del agente suficientemente altas para tener un beneficio terapéutico, sin sobredosis sistémica. Adicionalmente, la absorción frecuente de un agente diagnóstico o terapéutico por vía del tubo gastrointestinal es indeseable debido a que esto puede conducir a la alteración química indeseada del agente por vía de procesos metabólicos normales.

A pesar de las estructuras macroscópicas tal como la piel, las células son generalmente impermeables o casi impermeables a muchos terapéuticos de agentes de diagnóstico, particularmente si los agentes son macromoléculas, tal como proteínas y ácidos nucleicos. Más aún, algunas moléculas pequeñas
5 ingresan células vivas a velocidades muy bajas. La carencia de medios para suministrar macromoléculas en células in vivo ha sido un obstáculo para el uso terapéutico, profiláctico y diagnóstico de potencialmente un gran número de agentes diagnósticos y terapéuticos que tienen sitios de acción intracelular, tal como proteínas y ácidos nucleicos.

10

Se han desarrollado varios métodos para suministrar macromoléculas en las células in vitro. Una lista de tales métodos incluye electroporación, fusión de membrana con liposomas, bombardeo de alta velocidad con microproyectiles recubiertos de ADN, incubación con precipitado de calcio-fosfato-ADN,
15 transfección mediada por DEAE-dextrano, infección con ácidos nucleicos víricos modificados, y microinyección directa de células únicas. Estos métodos in vitro suministran típicamente las moléculas de ácido nucleico en solo una fracción de la población celular total, y ellos conducen al daño de grandes números de células.

El suministro experimental de las macromoléculas en las células in vivo se ha
20 llevado a cabo con raspado de carga, precipitados de fosfato de calcio o liposomas. Sin embargo, estas técnicas, hasta la fecha, han mostrado utilidad limitada para el suministro celular in vivo. Más aún, aún con células in vitro, tales métodos son de utilidad extremadamente limitada para el suministro de proteínas.

25 Se necesitan métodos generales para el suministro eficiente de las proteínas biológicamente activas en células intactas, in vitro e in vivo. (L. A. Stemson, "Obstacles to Polypeptide Delivery", Ann. N. Y. Acad. Sci, 57, pp. 19-21 (1987)).

La adición química de un lipopéptido (P. Hoffmann et al., "Stimulation of Human and Murine Adherent Cells by Bacterial Lipoprotein and Synthetic Lipopeptide Analogues", *Immunobiol.*, 177, pp. 158- 70 (1988)) o un polímero básico tal como polilisina o poliarginina (W. -C. Chen et al., "Conjugation of Poly-L-Lysine Albumin and Horseradish Peroxidase: A Novel Method of Enhancing the Cellular Uptake of Proteins", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, pp. 1872- 76 (1978)) que no se ha probado que es altamente confiable o generalmente útil. El ácido fólico ha sido utilizado como un grupo funcional de transporte (C. P. Leamon and Low, *Delivery of Macromolecules into Living Cells: A method That Exploits Folate Receptor Endocytosis*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, pp. 5572-76 (1991)). Se presenta evidencia para la internalización de conjugados de folato, pero no para suministro citoplásmico. Dados los altos niveles de circulación de folato in vivo, la utilidad de este sistema no se ha demostrado completamente. Las pseudomonas exotoxina también se han utilizado como un grupo funcional de transporte (T. I. Prior et al., "Barnase Toxin: A New Chimeric Toxin Composed of Pseudomonas Exotoxin A and Barnase", *Cell*, 64, pp. 1017-23 (1991)). Sin embargo, la eficiencia y aplicabilidad general de este sistema para el suministro intracelular de las moléculas de carga biológicamente activas no es claro a partir del trabajo publicado.

20

Un método reportado previamente para el suministro intracelular de ciertas clases de agentes terapéuticos involucra utilizar agentes de transporte que contienen la región básica de la proteína HIV-TAT para el suministro intracelular de ciertas clases de compuestos. Ver, por ejemplo, Las Patentes Estadounidenses Nos. 5,652,122; 5,670,617; 5,674, 980; 5,747,641 ; 5,804,604; y 6,316,003. Adicionalmente, se ha reportado que la proteína TAT del virus de inmunodeficiencia humano purificado tipo I ("HIV") se toma del medio circundante

25

al hacer crecer células humanas en el cultivo (A. D. Frankel y C. O. Pabo, "Cellular Uptake of the TAT Protein from Human Immunodeficiency Virus", Cell, 55, pp. 1189-93 (1988)). Generalmente, la proteína TAT transactiva ciertos genes HIV y es esencial para la replicación vírica. La proteína HIV-TAT de longitud completa

5 tiene 86 residuos de aminoácido. El gen HIV TAT tiene dos exones. Los aminoácidos TAT 1-72 se codifican por el exón 1, y los aminoácidos 73-86 se codifican por el exón 2. La proteína TAT de longitud completa se caracteriza por una región básica que contiene dos lisinas y seis argininas (49-57 aminoácidos) y una región rica en cisteína que contiene siete residuos cisteína (22-37

10 aminoácidos). En particular, la región básica (es decir, 49-57 aminoácidos) se considera que es importante para la localización nuclear. (Ruben, S. et al., J. Virol. 63: 1-8 (1989); Hauber, J. et al., J. Virol. 63: 181-187 (1989)).

RESUMEN DE LA INVENCION

15

Mientras la región básica del HIV-TAT se ha utilizado previamente para incrementar el suministro intracelular de ciertas clases de moléculas, esta invención se basa en el hallazgo inesperado que la secuencia inversa de la región básica de HIV-TAT se puede utilizar para incrementar el suministro de

20 transmembrana o intracelular de la molécula de carga, como se define aquí. Como un resultado de este hallazgo, esta invención proporciona moléculas de transporte novedosas que son capaces de incrementar la penetración de transmembrana o intracelular de las moléculas de carga. Así, las moléculas de transporte de la presente invención se pueden utilizar para suministrar una molécula de carga a

25 través de la membrana (por ejemplo, transdérmicamente) o a través de una membrana celular en células eucarióticas (por ejemplo, en el núcleo celular o citoplasma), in vitro o in vivo. Esta invención se relaciona adicionalmente con unir

covalentemente o no covalentemente conjugados de una molécula de transporte y una molécula de carga.

Adicionalmente, esta invención proporciona un método para utilizar las moléculas de transporte novedosas de la invención para incrementar la penetración de transmembrana o intracelular de las moléculas de carga. Este método es particularmente adecuado para las moléculas de carga que (1) no son inherentemente capaces de ingresar células objetivo, núcleos celulares, o membranas, o (2) no son inherentemente capaces de ingresar las células objetivo, núcleos celulares, o membranas a una velocidad útil. En ciertas modalidades preferidas, las moléculas de transporte de la invención son útiles para el suministro de proteínas o péptidos, tal como factores reguladores, enzimas, anticuerpos, fármacos o toxinas, así como también ADN o ARN, en el núcleo celular o a través de las membranas. Las moléculas de carga particularmente preferidas incluyen toxinas, ejemplos no limitantes de las cuales incluyen toxinas botulinum, waglerina, y tétanos. El suministro intracelular de las moléculas de carga de acuerdo con esta invención se lleva a cabo mediante la administración de conjugados de las moléculas de transporte novedosas y las moléculas de carga a las células de interés. En otras modalidades, la invención proporciona métodos para el suministro de las moléculas de carga a través de las membranas, al administrar un conjugado de molécula de transporte/ molécula de carga a las membranas de interés. En una modalidad particularmente preferida, el conjugado de molécula de transporte/carga de molécula se administra tópicamente para proporcionar la penetración transdérmica de la molécula de carga de interés.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1: penetración percutánea In vitro de radioactividad asociada con ^{125}I en piel humana con K15RT2, quince (15) lisina con un polipéptido que corresponde a la SEQ ID NO. 1 unido al extremo por vía de un espaciador G.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Formación de las moléculas de transporte

10

Las moléculas de transporte preferidas de esta invención se caracterizan por la presencia de un polipéptido que tiene una secuencia que corresponde a la secuencia inversa de la secuencia de aminoácido de región básica HIV-TAT (49-57 aminoácidos de la proteína HTV-TAT de ocurrencia natural). Esta secuencia inversa de la región básica HFV-TAT, que es RRRQRRKKR (SEQ ID NO. 1) se refiere aquí adelante como el "polipéptido de secuencia inversa", y se puede adherir covalentemente o no covalentemente a una molécula de carga de interés para formar un conjugado. En ciertas modalidades, es ventajoso adherir covalentemente uno o más polipéptidos de secuencia inversa para una molécula de carga de interés, directamente o por vía de un péptido o ligador polimérico. Por ejemplo, el polipéptido de secuencia inversa se puede adherir ventajosamente a las moléculas de carga mediante reticulación química o por fusión genética, como se describe aquí.

25 Variantes del polipéptido de secuencia inversa también se contemplan mediante esta invención. Generalmente, cualquier variante del polipéptido de secuencia inversa que se puede utilizar en una molécula de transporte para mejorar la

penetración transdérmica o de transmembrana de una molécula de carga se considera una parte de esta invención. Por ejemplo, en algunas modalidades, las variantes del polipéptido de secuencia inversa se producen por la eliminación y/o sustitución de por lo menos un aminoácido presente en el polipéptido de

5 secuencia inversa para producir un polipéptido de secuencia inversa modificado. Los polipéptidos de secuencia inversa modificados así se pueden producir al tener las secuencias de aminoácido que son sustancialmente similares, aunque no idénticos, a los del polipéptido de secuencia inversa. Los polipéptidos de

10 secuencia inversa modificados preferidos incluyen aquellos que son funcionalmente equivalentes, o funcionalmente sus fragmentos de péptido equivalentes. Tales equivalentes funcionales o fragmentos funcionalmente equivalentes poseen la capacidad de penetración de transmembrana y intracelular que es sustancialmente similar a la del polipéptido de secuencia inversa de

ocurrencia natural.

15

Los polipéptidos de secuencia inversa o sus variantes se pueden obtener al utilizar una variedad de métodos, que incluyen técnicas de ingeniería genética o síntesis química. En ciertas modalidades preferidas, se pueden hacer una o más

20 sustituciones para modular las capacidades de penetración del polipéptido de secuencia inversa, tal que la molécula de transporte resultante tiende a localizar en ciertas áreas, tal como el citoplasma de una célula objetivo. El comportamiento similar se ha observado previamente para la región básica de HIV- TAT de

ocurrencia natural, y se ha utilizado para localizar o para localizar parcialmente el fragmento HTV-TAT en el citoplasma (ver por ejemplo, Dang, C. V. y Lee, W. M.

25 F., J. Biol. Chem. 264: 18019-18023 (1989); Hauber, J. et al., J.Virol. 63: 1181-1187 (1989); Ruben, S. A. et al., J. Virol. 63: 1-8 (1989)). Alternativamente, una secuencia para unir un componente citoplásmico se puede adherir al polipéptido

de secuencia inversa con el fin de retener el polipéptido de secuencia inversa y la molécula de carga en el citoplasma o para regular la retoma nuclear de una molécula de carga. En otras modalidades, el colesterol u otros derivados lípidos se pueden agregar al polipéptido de secuencia inversa o su variante para incrementar la solubilidad de la membrana de la molécula de transporte. Por supuesto, el suministro de una molécula de carga dada para el citoplasma se puede seguir por el suministro adicional de la misma molécula de carga para el núcleo. El suministro nuclear necesariamente involucra a travesar alguna porción del citoplasma.

- 10 Mientras que el polipéptido de secuencia inversa es útil para proporcionar el suministro de transmembrana o intracelular de las moléculas de carga, las moléculas de transporte contempladas por esta invención también pueden contener cualquier otra porción de la proteína nativa HTV-TAT que mejora el transporte de transmembrana o intracelular. Por ejemplo, si se desea, las
- 15 moléculas de transporte también pueden contener todos los 86 residuos del polipéptido HIV-TAT completo que tiene la secuencia de una región de la proteína HTV-TAT nativa que incrementa la secuencia de cualquier porción de esta que demuestra la retoma activante incrementada, ejemplos no limitantes los cuales incluyen los residuos 1-58, 37-72, o 49-57. Sin embargo, en modalidades
- 20 preferidas, la molécula de transporte no contiene la región rica en cisteína de HIV-TAT, que corresponde a 22-37 aminoácidos de la secuencia HIV-TAT nativa, y en la que 7 de 16 aminoácidos son cisteína. Aquellos residuos cisteína son capaces de formar enlaces disulfuro con cada uno, con residuos cisteína en la región rica en cisteína de las otras moléculas de proteína HTV-TAT o sus fragmentos que
- 25 pueden estar presentes, y con residuos cisteína que pueden existir en una proteína o polipéptido que constituye la molécula de carga de interés. Tal formación de enlace disulfuro puede originar pérdida de la actividad biológica de la

molécula de carga. Adicionalmente, aún si no hay potencial para la unión de disulfuro a la molécula de carga (por ejemplo, cuando el agente terapéutico es una proteína sin residuos cisteína), la formación del enlace disulfuro entre las moléculas de transporte conduce a la agregación y insolubilidad de la molécula de transporte, el conjugado de molécula de transporte- molécula de carga, o ambas. Así, la región rica en cisteína de la proteína HIV-TAT nativa es potencialmente una fuente de serios problemas en el uso de las proteínas relacionadas con HTV-TAT para el suministro de los agentes diagnósticos o terapéuticos. Por virtud de la ausencia de la región rica en cisteína presente en las proteínas HTV-TAT, las moléculas de transporte preferidas de esta invención evitan el problema de agregación disulfuro, que puede resultar en la pérdida de la actividad biológica o insolubilidad del conjugado covalente o no covalente del agente polipéptido/terapéutico de transporte, o ambos. Más aún, el tamaño reducido de las moléculas de transporte preferidas de esta invención también minimiza ventajosamente la interferencia con la actividad biológica del agente diagnóstico o terapéutico. Una ventaja adicional del tamaño de molécula de transporte reducido mejora la eficiencia de la retoma en las modalidades de esta invención que involucra la adherencia de múltiples polipéptidos de secuencia inversa por molécula de carga.

20

Adicionalmente, esta invención también contempla moléculas de transporte que contienen uno o más polipéptidos de secuencia inversa en conjunto con proteínas TAT de otros virus, ejemplos no limitantes los cuales incluyen HIV-2 (M. Guyader et al., "Genome Organization and Transactivation of the Human Immunodeficiency Virus Type 2", Nature, 326, pp. 662-669 (1987)), virus de la anemia infecciosa equina (R. Carroll et al., "Identification of Lentivirus TAT Functional Domains Through Generation of Equine Infectious Anemia Virus/Human Immunodeficiency

25

Virus Type 1 TAT Gene Chimeras", J. Virol., 65, pp. 3460-67 (1991)), y virus de inmunodeficiencia del simio (L. Chakrabarti et al., "Sequence of Simian Immunodeficiency Virus from Macaque y Its Relationship to Other Human y Simian Retroviruses", Nature, 328, pp. 543-47 (1987); S. K. Arya et al., "New Human and
5 Simian HTV-Related Retroviruses Possess Functional Transactivator (tal) Gene", Nature, 328, pp. 548-550 (1987)) . Se debe entender que moléculas de transporte que comprenden el polipéptido de secuencia inversa y cualquier polipéptido se derivan de estas otras proteínas TAT caben dentro del alcance de la presente invención, que incluyen aquellos caracterizados por la presencia de la región
10 básica TAT y la ausencia de la región rica en cisteína TAT.

Las moléculas de transporte de esta invención se pueden sintetizar químicamente o producir mediante métodos de ADN recombinantes cuando las moléculas de transporte son polipéptidos. Los métodos para la síntesis química o producción de
15 ADN recombinante de polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácido conocida son bien conocidos. El equipo automático para el polipéptido o la síntesis de ADN está disponible comercialmente. Las células anfitrionas, vectores de clonación, secuencias de control de expresión de ADN y ligadores de oligonucleótido también están disponibles comercialmente para preparar el
20 polipéptido de moléculas de transporte.

De acuerdo con la invención, una molécula de carga se combina, covalentemente o no covalentemente, con una molécula de transporte para formar un conjugado. En modalidades preferidas, las moléculas de carga contempladas mediante la
25 invención incluyen cualquier sustancia que tiene aplicación diagnóstica, profiláctica o terapéutica. Sin embargo, cualquier agente biológicamente activo también se contempla por esta invención, que incluye las moléculas de carga que pueden

tener un efecto adverso en el receptor, tal como una toxina que es útil para animales que se les practica eutanasia. Existe un amplio margen en la selección de las moléculas de carga para uso en la práctica de esta invención. Ejemplos no limitantes de las moléculas de carga contempladas por esta invención incluye

5 fármacos, agentes diagnósticos, enzimas, proteínas, polipéptidos, oligonucleótidos, antígenos, y toxinas. Las moléculas de carga contempladas por la invención se pueden obtener o producir al utilizar técnicas conocidas, tal como síntesis químicas, métodos de ingeniería genética, o aislamiento de fuentes en las que esto ocurre naturalmente.

10

En una modalidad preferida, la molécula de carga es una molécula toxina que se deriva de un serotipo de toxina botulinum. Se prefieren particularmente toxinas aisladas directamente de los serotipos de botulinum A, B, C, D, E, F, y G, aunque formas modificadas de estos serotipos de botulinum también se consideran

15 expresamente por ser una parte de esta invención. Tales formas modificadas incluyen, sin limitación, moléculas de toxina las cuales contienen adiciones o eliminaciones de residuos de aminoácido, dado que aquellas adiciones o eliminaciones no alteran sustancialmente el efecto biológico de la molécula de toxina. En otras modalidades, la molécula de carga es un antígeno y la

20 conjugación a la molécula de transporte es para el propósito de elaborar una vacuna. Por ejemplo, la molécula de carga puede ser un antígeno de la bacteria o virus u otro agente infeccioso contra el que la vacuna inmuniza (por ejemplo, gp120 de HIV). Proporcionar el antígeno en el citoplasma celular permite a la célula procesar la molécula y expresarla en la superficie celular. La expresión del

25 antígeno en la superficie celular elevará una respuesta de linfocito T citotóxico, que induce por lo tanto inmunidad.

En todavía otra modalidad de la invención, la molécula de carga es una proteína, tal como una enzima, anticuerpo, toxina, o factor regulador (por ejemplo, factor de transcripción) cuyo suministro en las células, y particularmente se desea en el núcleo celular. Por ejemplo, algunos oncogenes víricos encienden
5 inapropiadamente la expresión de los genes celulares al unirlos a sus promotores. Al proporcionar una proteína de unión competente en el núcleo celular, se puede inhibir la actividad de encogen vírica.

En una modalidad adicional, la molécula de carga es una secuencia de nucleótido
10 a ser utilizada como una herramienta diagnóstica (o sonda), o como un agente terapéutico, tal como una secuencia de oligonucleótido que es complementaria al gen celular objetivo o región de gen y capaz de inhibir la actividad del gen celular o la región de gen al hibridarlo con este. La velocidad en la que los ácidos nucleicos monocatenarios y bicatenarios ingresan células, in vitro y in vivo, se pueden
15 mejorar ventajosamente, al utilizar las moléculas de transporte de esta invención. Por ejemplo, los métodos para la reticulación química de los polipéptidos a ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica. En una modalidad preferida de esta invención, la molécula de carga es un ácido nucleico anticodificante monocatenario. Los ácidos nucleicos anticodificantes son útiles para inhibir la
20 expresión celular de las secuencias las cuales son complementarias. En otra modalidad de esta invención, la molécula de carga es un ácido nucleico bicatenario que comprende un sitio de unión reconocido por una proteína de unión de ácido nucleico. Un ejemplo de tal proteína de unión de ácido nucleico es un transactivador vírico.

La molécula de carga de interés también puede ser un fármaco, tal como un análogo de péptido o inhibidor de enzima de molécula pequeña, cuya introducción se desea específicamente y es confiable en un núcleo celular.

- 5 Las moléculas de carga de esta invención también pueden ser agentes diagnósticos que proporcionan información, in vitro o in vivo, alrededor del ambiente local en donde las moléculas de carga están presentes. Los factores a ser considerados al seleccionar agentes diagnósticos incluyen, pero no se limitan a, el tipo de información experimental buscada, la afección a ser diagnosticada o
- 10 detectada por imagen, la ruta de administración, no toxicidad, conveniencia de detección, cuantificabilidad de detección, y disponibilidad. Muchos tales agentes diagnósticos se conocen por aquellos expertos en la técnica. Ejemplos no limitantes de los agentes diagnósticos adecuados incluyen agentes de contraste radiopacos, agentes de contraste paramagnéticos, agentes de contraste
- 15 superparamagnéticos, agentes de contraste CT y otros agentes de contraste. Por ejemplo, los agentes de contraste radiopacos (para imagen de rayos X) incluirán compuestos de yodo orgánicos e inorgánicos (por ejemplo, diatrizoato), metales radiopacos y sus sales (por ejemplo, plata, oro, platino y similares) y otros compuestos radiopacos (por ejemplo, sales de calcio, sales de bario tal como
- 20 sulfato de bario, tántalo y óxido de tántalo). Los agentes de contraste paramagnéticos adecuados (para imagen MR) incluyen ácido triaminapentaacético dietileno gadolinio (Gd-DTPA) y sus derivados, y otro gadolinio, manganeso, hierro, disprosio, cobre, europio, erbio, cromo, níquel y complejos de cobalto, que incluye complejos con ácido 1,4,7,10- tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-
- 25 tetraacético (DOTA), ácido etilenodiaminetetraacético (EDTA), ácido 1,4,7,10- tetraazaciclododecano-N,- N',N''-triacético (DO3A), ácido 1,4,7- triazaciclononano-N,N',N''-triacético (NOTA), ácido 1,4,8,10-tetraazaciclotetradecano- N,N',N'',N'''-

tetraacético (TETA), ácido hidroxibenciletileno-diamina diacético (HBED) y similares. Los agentes de contraste superparamagnéticos adecuados (para formación de imagen MR) incluyen magnetitas, óxidos de hierro superparamagnéticos, óxidos de hierro monocristalino, particularmente formas complejadas de cada uno de estos agentes que se pueden adherir covalentemente o no covalentemente a un polipéptido de secuencia inversa o una estructura cargada positivamente que contiene un polipéptido de secuencia inversa, como se describe aquí. Todavía otros agentes de imagen adecuados son los agentes de contraste CT que incluyen agentes de contraste CT yodizados y no yodizados y iónicos y no iónicos, así como también agentes de contraste tal como etiquetas de giro u otros agentes diagnósticamente efectivos.

Otros ejemplos de agentes diagnósticos incluyen genes etiquetadores que codifican las proteínas que son fácilmente detectables cuando se expresan en una célula, que incluyen, pero no se limitan a, β -galactosidasa, proteína fluorescente verde, proteína fluorescente azul, luciferasa, y similares. Una amplia variedad de etiquetas se pueden emplear, tal como radionúclidos, fluoros, enzimas, sustratos de enzima, cofactores de enzima, inhibidores de enzima, ligandos (particularmente haptenos), y similares. Todavía otras sustancias útiles son aquellas etiquetadas con especies radioactivas o componentes, tal como glucoheptonato ^{99m}Tc .

La adherencia de la molécula de carga para la molécula de transporte se puede efectuar por cualquier medio que produce un enlace entre los dos constituyentes que es suficientemente estable para resistir las condiciones utilizadas y que, no alteran la función del constituyente. El enlace entre ellos puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, las técnicas recombinantes se pueden utilizar para adherir covalentemente las moléculas transportadoras que son polipéptidos para las

moléculas de carga basadas en proteína/polipéptido, al unir al gen que codifica a la molécula de carga con el gen que codifica la molécula transportadora de polipéptido y luego introducir la construcción del gen resultante en una célula capaz de expresar el conjugado. Alternativamente, las dos secuencias de nucleótido separadas se pueden expresar en una célula o se pueden sintetizar químicamente y posteriormente unir covalentemente, al utilizar técnicas conocidas. También, el conjugado de molécula de carga con base proteína/péptido con la molécula transportadora se puede sintetizar químicamente como una secuencia de aminoácido única (es decir, una en la cual ambos constituyentes están presentes) y, así, unir si no se necesita.

Se conocen numerosos métodos de reticulación químicos y son potencialmente aplicables para conjugar los polipéptidos de transporte de esta invención a las moléculas de carga que son macromoléculas. Muchos métodos de reticulación químicos conocidos no son específicos, es decir, ellos no dirigen el punto de acoplamiento a cualquier sitio particular en el polipéptido de transporte o macromolécula de carga. Como un resultado, el uso de agentes de reticulación no específicos puede atacar sitios funcionales o bloquear sitios activos estéricamente, produciendo las proteínas conjugadas biológicamente inactivas.

Un método preferido para incrementar la especificidad de acoplamiento en la práctica de esta invención se dirige al acoplamiento químico a un grupo funcional encontrado solo una vez o unas pocas veces en uno o ambos polipéptidos a ser reticulados. Por ejemplo, en muchas proteínas, la cisteína, que es solo el aminoácido de proteína que contiene un grupo tiol, ocurre solo unas pocas veces. También, por ejemplo, si un polipéptido no contiene residuos lisina, un reactivo de reticulación específico para aminas primarias será selectivo para el terminal amino

S1

del polipéptido. La utilización exitosa de este método para incrementar los requerimientos de especificidad de acoplamiento requiere que el polipéptido tiene los residuos reactivos y raros adecuados en áreas de la molécula que se pueden alterar sin la pérdida de la actividad biológica de la molécula.

5

Los residuos cisteína se pueden reemplazar cuando ellos ocurren en partes de una secuencia de polipéptido en donde su participación en una reacción de reticulación interferiría de forma similar con la actividad biológica. Cuando un residuo cisteína se reemplaza, es típicamente deseable minimizar los cambios resultantes en polipéptido de pliegue. Los cambios en polipéptido de pliegue se minimizan cuando el replazo es químicamente y estéricamente similar a la cisteína. Por estas razones, se prefiere la serina como un reemplazo para la cisteína. Un residuo cisteína se puede introducir en una secuencia de aminoácido del polipéptido para propósitos de reticulación. Cuando se introduce un residuo

10 cisteína, se prefiere la introducción en o cerca al terminal amino o carboxi. Métodos convencionales están disponibles para tales modificaciones de la secuencia de aminoácido, si el polipéptido de interés se produce mediante síntesis

15 química o expresión de ADN recombinante.

20 El acoplamiento de los dos constituyentes se puede llevar a cabo por vía de un agente de acoplamiento o conjugación. Existen varios reactivos de reticulación intermolecular que se pueden utilizar (ver, por ejemplo, Means, G. E. y Feeney, R. E., Chemical Modification of Proteins, Holden-Day, 1974, pp. 39-43). Entre estos reactivos están, por ejemplo, J- succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) o

25 N,N'-(1,3-fenileno) bismaleimida (ambos de los cuales son altamente específicos para los grupos sulfhidrilo y forman ligados irreversibles); N, N'-etileno-bis-(yodoacetamida) u otro tal reactivo que tiene 6 a 11 puentes de metileno carbono

(que son relativamente específicos para los grupos sulfhidrilo); y 1,5- difluoro-2,4-
dinitrobenceno (que forma ligados irreversibles con los grupos amino y tirosina).
Otros reactivos de reticulación útiles para este propósito incluyen: p,p'-difluoro-
m,m'-dinitrodifenilsulfona (que forma reticulaciones irreversibles con los grupos
5 amino y fenólicos); dimetil adipimidato (que es específico para los grupos amino);
fenol-1,4-disulfonilcloruro (que reacciona principalmente con grupos amino);
hexametenodiisocianato o diisotiocianato, o azofenil-p-diisocianato (que
reacciona principalmente con los grupos amino); glutaraldehído (que reacciona
con varias diferentes cadenas laterales) y disdiazobenzidina (que reacciona
10 principalmente con tirosina y histidina).

Los reactivos de reticulación pueden ser homobifuncionales, es decir, que tiene
dos grupos funcionales que experimentan la misma fracción. Un reactivo de
reticulación homobifuncional preferido es bismaleimidohexano ("BMH"). El BMH
15 contiene dos grupos funcionales maleimida, que reaccionan específicamente con
compuestos que contienen sulfhidrilo bajo condiciones suaves (pH 6.5-7.7). Los
dos grupos maleimida se conectan mediante una cadena de hidrocarburo. Por lo
tanto, el BMH es útil para la reticulación irreversible de los polipéptidos que
contienen los residuos cisteína.

Los reactivos de reticulación también pueden ser heterobifuncionales los agentes
de reticulación heterobifuncional tienen dos grupos funcionales diferentes, por
ejemplo un grupo reactivo amina y un grupo reactivo tiol, que reticulará dos
proteínas que tienen aminas libres y tioles, respectivamente. Ejemplos de agentes
25 de reticulación heterobifuncionales son succinimidil 4-(N-
maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato ("SMCC"), m-maleiraidobenzoil-N-
hidroxisuccinimida éster ("MBS"), y succinimida 4-(p-maleimidofenil)butirato

("SMPB"), un análogo de cadena extendida de MBS. El grupo succinimidilo de estas reticulaciones reacciona con una amina primaria, y la maleimida reactiva con tiol forma un enlace covalente con el tiol de un residuo cisteína.

5 Los reactivos de reticulación frecuentemente tienen baja solubilidad en el agua. Un grupo funcional hidrófilo, tal como un grupo sulfonato, se puede agregar al reactivo de reticulación para mejorar su solubilidad en el agua. Sulfo-MBS y sulfo-SMCC son ejemplos de los reactivos de reticulación modificados para solubilidad en agua.

10

Muchos reactivos de reticulación producen un conjugado que es esencialmente no clivable bajo condiciones celulares. Sin embargo, algunos reactivos de reticulación contienen un enlace covalente, tal como un disulfuro, que es divisible bajo condiciones celulares. Por ejemplo, ditiobis(succinimidilpropionato) ("DSP"), el reactivo Traut y N-succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato ("SPDP") son reticuladores divisibles bien conocidos. El uso de un reactivo de reticulación divisible permite al grupo funcional de carga separar del polipéptido de transporte después del suministro en la célula objetivo. El ligado disulfuro directo también puede ser útil.

20

Algunos nuevos reactivos de reticulación tal como n-γ-maleimidobutiriloxi-succinimida éster ("GMBS") y sulfo-GMBS, tienen inmunogenicidad reducida. En algunas modalidades de la presente invención, tal inmunogenicidad reducida puede ser ventajosa.

25

Numerosos reactivos de reticulación, que incluyen aquellos discutidos anteriormente, están disponibles comercialmente. Las instrucciones detalladas

SA

para su uso están fácilmente disponibles de proveedores comerciales. Una referencia general en la reticulación de proteína y preparación de conjugado es: S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press (1991).

5 La reticulación química puede incluir el uso de brazos espaciadores. Los brazos espaciadores proporcionan flexibilidad intramolecular o ajuste de las distancias intramoleculares entre los grupos funcionales conjugados y de esta forma puede ayudar a preservar la actividad biológica. Un brazo espaciador puede estar en la forma de un grupo funcional de polipéptido que comprende los aminoácidos
10 espaciadores. En una modalidad particular, el ligador espaciador se compone de una o más unidades glicina, tal como un dímero GG, por ejemplo. Alternativamente, un brazo espaciador puede ser parte de el reactivo de reticulación, tal como en "SPDP de cadena larga" (Pierce Chem. Co., Rockford, IU., cat. No. 21651 H).

15

Se reconocerá por aquellos medianamente expertos en la técnica que cuando el polipéptido de transporte se fusiona genéticamente al grupo funcional de carga, es ventajoso agregar una metionina de terminal amino, pero los aminoácidos espaciadores (por ejemplo, CysGlyGly o GlyGlyCys) se necesitan agregar en
20 algunas modalidades. Un residuo cisteína de Terminal único es un medio preferido de reticulación química. De acuerdo con algunas modalidades preferidas de esta invención, el terminal carboxi del polipéptido de secuencia inversa se fusiona genéticamente al terminal amino de una molécula de carga que incluye un polipéptido o proteína.

25

En ciertas modalidades preferidas, el polipéptido de secuencia inversa es en sí mismo una molécula de transporte que no se asocia covalentemente con una

molécula de carga para formar un conjugado no covalente que mejora el suministro de la molécula de carga. Alternativamente, el polipéptido de secuencia inversa se adhiere covalentemente, no a la molécula de carga, sino en su lugar a una molécula de estructura (directamente o por vía de un ligador) para formar una

5 molécula de transporte que no se asocia covalentemente con la molécula de carga para formar un conjugado. En una modalidad particularmente preferida, la molécula de transporte incluye una o más copias del polipéptido de secuencia inversa, unidas covalentemente a una estructura cargada positivamente. Opcionalmente, otros fragmentos que mejoran el transporte-del HTV-TAT nativo o

10 de las proteínas TAT de otros virus se pueden adherir bien a la estructura cargada positivamente. Una estructura cargada positivamente es típicamente una cadena lineal de átomos, con grupos en la cadena que lleva una carga positiva en el pH fisiológico, o con grupos que llevan una carga positiva adherida a cadenas laterales que se extienden de la estructura. La estructura lineal es una estructura

15 de hidrocarburo, que, en algunas modalidades, se interrumpe mediante heteroátomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno, azufre, silicona y fósforo. La mayoría de átomos de la cadena de estructura son usualmente carbono. Adicionalmente, la estructura será frecuentemente un polímero de unidades de repetición (por ejemplo, aminoácidos, poli(etilenooxi), polipropilenoamino), y

20 similares). En un grupo de modalidades, la estructura cargada positivamente es una polipropilenoamina en donde un número de los átomos de nitrógeno amina están presentes como los grupos amonio (tetra-sustituidos) que llevan una carga positiva. En otro grupo de modalidades, la estructura tiene adherida una pluralidad de grupos funcionales de cadena lateral que incluyen grupos cargados

25 positivamente (por ejemplo, grupos amonio, grupos piridinio, grupos fosfonio, grupos sulfonio, grupos guanidinio, o grupos amidinio). Los grupos funcionales de cadena lateral en este grupo de modalidades se pueden colocar en los espacios a

lo largo de la estructura que son consistentes en separaciones o variables. Adicionalmente, la longitud de las cadenas laterales puede ser similar o diferente. Por ejemplo, en un grupo de modalidades, las cadenas lineales pueden ser cadenas de hidrocarburo lineales o ramificadas que tienen de uno a veinte átomos de carbono y terminar en el extremo distal (siempre de la estructura) en uno de los grupos cargados positivamente notados anteriormente.

En un grupo de modalidades, la estructura cargada positivamente es un polipéptido que tiene múltiples grupos de cadena lateral cargada positivamente (por ejemplo, lisina, arginina, ornitina, homoarginina, y similares). Un experto en la técnica apreciará que cuando se utilizan aminoácidos en esta porción de la invención, las cadenas laterales pueden tener la forma D- o L- (configuración R o S) en el centro de adhesión.

Alternativamente, la estructura puede ser un análogo de un polipéptido tal como un peptoide. Ver, por ejemplo, Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32:543 (1993); Zuckermann et al. *Chemtracts-Macromol. Chem.* 4:80 (1992); y Simon et al. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89:9367 (1992)). En resumen, un peptoide es una poliglicina en la que la cadena lateral se adhiere a los átomos de nitrógeno de la estructura que en los átomos de carbono α . Como anteriormente, una porción de las cadenas terminales terminará típicamente en un grupo cargado positivamente para proporcionar un componente de la estructura cargada positivamente. La síntesis del peptoide se describe en, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5,877,278. Como se utiliza el término aquí, las estructuras cargadas positivamente que tienen una construcción de estructura peptoide se consideran "no péptido" cuando ellas no se componen de aminoácidos que tienen cadenas laterales de ocurrencia natural en las ubicaciones α -carbono.

S1

Se puede utilizar una variedad de otras estructuras empleando, por ejemplo, imitadores estéricos o electrónicos de polipéptidos en donde los ligados amida del péptido se reemplazan con subrogados tal como ligados éster, grupos tioamida (5 CSNH--), tioamida inversa (-- NHCS--), aminometileno (-- NHCH₂--) o el metilenoamino inverso (--CH₂NH--), grupos ceto-metileno (--COCH₂--), fosfinato (--PO₂RCH₂--), fosfonamidato y éster fosfonamidato (--PO₂RNH--), péptido inverso (--NHCO--), trans-alqueno (--CR=CH--), fluoroalqueno (-CF=CH-), dimetileno (--CH₂CH₂--), tioéter (--CH₂S--), hidroxietileno (--CH(OH)CH₂--), metilenooxi (10 --CH₂O--), tetrazol (CN₄), sulfonamido (--SO₂NH--), metilenosulfonamido (---CHRSO₂NH--), sulfonamida inversa (--NHSO₂--), y estructuras con malonato y/o subunidades gem-diamino-alquilo, por ejemplo, como se revisa por Fletcher et al. ((1998) Chem. Rev. 98:763) y se detalla por las referencias citadas aquí. Muchas de las anteriores sustituciones resulta en aproximadamente estructuras de polímero 15 isostéricas relacionadas con estructuras formadas de aminoácidos α.

En otra modalidad particularmente preferida, la porción de la estructura es una polilisina y los polipéptidos de secuencia inversa se adhieren a los grupos amino de cadena lateral lisina. La polilisina utilizada en esta modalidad particularmente 20 preferida puede ser cualquiera de las polilisinias disponibles comercialmente (Sigma Chemical Company, St Louis, Mo., USA) tal como, por ejemplo, polilisina que tiene MW>70,000, polilisina que tiene MW de 70,000 a 150,000, polilisina que tiene MW 150,000 a 300,000 y polilisina que tiene MW>300,000. La selección apropiada de una polilisina dependerá de los componentes restantes de la 25 composición y será suficiente para proporcionar una carga pura general en la composición.

Suministro del conjugado de Molécula de transporte/Molécula de carga

Esta invención es generalmente aplicable para el suministro intracelular o de transmembrana terapéutico, profiláctico o diagnóstico de moléculas pequeñas y macromoléculas, tal como proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos, que no son inherentemente capaces de ingresar células objetivo o penetrar las membranas biológicas en una velocidad útil. Los procesos y composiciones de esta invención se pueden aplicar a cualquier organismo, que incluyen humanos. Los procesos y composiciones de esta invención también se pueden aplicar a los animales y humanos en el útero. De acuerdo con una modalidad preferida de esta invención, una molécula de carga se suministra en las células de varios órganos y tejidos luego de la introducción de un conjugado de molécula de transporte o carga en o dentro de un humano o animal vivo. Por ejemplo, el conjugado de molécula de carga/molécula de transporte se puede poner en contacto con células en las que la se desea la introducción de la molécula de carga. Como un resultado, el conjugado ingresa en las células, pasando en el núcleo. En otra modalidad, el conjugado de molécula de carga/molécula de transporte se administra en una superficie de membrana para originar la penetración de transmembrana del conjugado de molécula de carga/molécula de transporte. Por ejemplo, el conjugado de molécula de carga/molécula de transporte se puede administrar tópicamente a una región que se beneficiaría de la acción terapéutica de la molécula de carga. En una modalidad particularmente preferida, la molécula de carga es un serotipo de toxina botulinum, y el conjugado de molécula de carga/molécula de transporte se administra tópicamente en regiones de la piel que tienen surcos o arrugas, con el fin de reducir la apariencia de los surcos o arrugas.

59

Alternativamente, el conjugado de molécula de carga/molécula transportadora se puede suministrar in vivo mediante células que se producen e implantan en un individuo. Las células se construyen genéticamente por ingeniería dado que ellas expresan el conjugado de molécula de carga/molécula de transporte
5 continuamente in vivo.

Alternativamente, la presente invención se puede utilizar para suministrar una molécula de carga in vitro. Por ejemplo, en aplicaciones in vitro en las que la molécula de carga se suministra en las células en el cultivo, el conjugado de
10 molécula de carga/molécula de transporte se puede agregar simple al medio de cultivo. Esto es útil, por ejemplo, como un medio de suministro en las sustancias del núcleo cuyo efecto en la función celular se evalúa. Por ejemplo, se puede medir la actividad de los factores de transcripción purificados, o el ensayo in vitro se puede utilizar para proporcionar una prueba importante de la actividad de una
15 molécula de carga, antes de su uso en el tratamiento in vivo.

El suministro también se puede llevar a cabo in vitro al producir células que sintetizan el conjugado de molécula de carga/molécula de transporte deseado in vitro o al combinar una muestra (por ejemplo, sangre, médula ósea) obtenida de
20 un individuo con el conjugado de molécula de carga/transporte, bajo las condiciones apropiadas. Por ejemplo, una molécula de carga seleccionada en combinación con la proteína TAT o el conjugado de molécula de carga de interés-proteína TAT se puede combinar con una muestra obtenida de un individuo (por ejemplo, sangre, médula ósea) con el fin de introducir la molécula de interés en
25 células presentes en la muestra y, después de tratar en esta forma, la muestra regresa al individuo. Una serie de tratamientos llevados a cabo en esta forma se puede utilizar para evitar o inhibir los efectos de un agente infeccioso. Por ejemplo,

la sangre se puede remover de un individuo infectado con VIH u otro virus, o de un individuo con un defecto genético. La sangre luego se puede combinar con el conjugado de molécula de carga/molécula de transporte en el que la molécula de carga de interés es un fármaco capaz de inactivar el virus, o una secuencia de oligonucleótido capaz de hibridar a una secuencia de virus seleccionada e inactivarla o una proteína que complementa una proteína defectuosa o faltante, bajo condiciones apropiadas para la entrada en las células del conjugado y mantenimiento de la muestra en tal una afección que esta se puede regresar al individuo. Después de tratamiento, la sangre se regresa al individuo.

10

El suministro se puede llevar a cabo in vivo al administrar el conjugado de molécula de carga/molécula de transporte a un individuo en quien este se utiliza para propósitos diagnósticos, preventivos o terapéuticos. Las células objetivo pueden ser células in vivo, es decir, células que componen los órganos o tejidos de animales o humanos vivos, o microorganismos encontrados en animales o humanos vivos.

15

En algunas modalidades, el conjugado de molécula de transporte/ molécula de carga se combina con un agente que incrementa la estabilidad y penetración. Por ejemplo, iones de metal que unen a la proteína HIV-TAT e incrementan su estabilidad y penetración, se pueden utilizar para este propósito. Alternativamente, un agente lisosomotrópico se proporciona extracelularmente en conjunto con la molécula de transporte y carga de molécula con el fin de mejorar la retoma mediante las células. El agente lisosomotrópico se puede utilizar solo o en conjunto con un estabilizador. Por ejemplo, agentes lisosomotrópicos tal como cloroquina, raononsina, amantadina y metilamina, que se han mostrado por

20

25

incrementar la retoma de HTV-TAT de ocurrencia natural en algunas células por unos pocos cientos de veces, se puede utilizar para este propósito.

En otra modalidad, un péptido básico, tal como una secuencia de péptido que
5 corresponde a los residuos 38-58 o HIV-TAT o protamina, se proporciona extracelularmente con la molécula de transporte y carga de molécula para mejorar la retoma de la molécula de carga. Tales péptidos básico también se pueden utilizar solos, o en combinación con agentes estabilizantes o agentes lisosomotróficos.

10

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden ser para aplicaciones terapéuticas, profilácticas o diagnósticas, y pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación sólida, semi-sólida, y líquida, tal como comprimidos, píldoras, polvos, soluciones o suspensiones
15 líquidas, aerosoles, liposomas, supositorios, soluciones inyectables e infusibles y formas de liberación sostenida. La forma preferida depende del modo destinado de administración y la aplicación terapéutica, profiláctica o diagnóstica. De acuerdo con esta invención, un conjugado de molécula de carga/molécula de transporte seleccionado se puede administrar mediante rutas convencionales de
20 administración, tal como rutas parenterales, subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intralesionales, intrasternales, intracraneales o aerosol. Las rutas tópicas de administración también se pueden utilizar, con la aplicación de las composiciones localmente a una parte particular del cuerpo (por ejemplo, piel, tracto intestinal inferior, vagina, recto) donde sea apropiado. Las composiciones
25 también incluyen preferidamente portadores farmacéuticamente aceptables convencionales y adyuvantes que se conocen por aquellos expertos en la técnica.

62

Generalmente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular y administrar al utilizar los métodos y composiciones similares a aquellas utilizadas para los polipéptidos farmacéuticamente importantes tal como, por ejemplo, interferón alfa, se entenderá que las dosis convencionales variarán dependiendo de la molécula de carga particular involucrada, así como también la salud del paciente, peso, edad, sexo, la afección o enfermedad y el modo deseado de administración. Las composiciones farmacéuticas de esta invención incluyen portadores farmacológicamente apropiados, adyuvantes y vehículos. En general, estos portadores incluyen soluciones acuosas o alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen solución salina y medio amortiguado. Los vehículos parenterales pueden incluir solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, aceite de Ringer lactado o fijo. Adicionalmente, los vehículos intravenosos pueden incluir reaprovisionadores de fluido y nutriente, y reaprovisionadores de electrolitos, tal como aquellos basados en dextrosa de Ringer. Los conservantes y otros aditivos también pueden estar presentes, tal como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes. Ver, generalmente, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mack, ed. 1980.

Se debe apreciar, sin embargo, que modalidades alternas de esta invención no se limitan a aplicaciones clínicas. Esta invención se puede aplicar ventajosamente en investigación médica y biológica. En aplicaciones de investigación de esta invención, la molécula de carga puede ser un fármaco o un agente diagnóstico. Las moléculas de transporte de esta invención se pueden utilizar como reactivos de laboratorio de investigación, solas o como parte de un equipo de conjugación de molécula de transporte.

Mientras describimos un número de modalidades de esta invención, es evidente que nuestras construcciones básicas se pueden alterar para proporcionar otras modalidades que utilizan los procesos y productos de esta invención. Por lo tanto, se apreciará que el alcance de esta invención se define por las reivindicaciones
5 adjuntas que por las modalidades específicas que se han presentado por vía de ejemplo.

Ejemplo 1

10 El objetivo del presente estudio es evaluar la posibilidad de suministrar una molécula de carga grande (toxina botulinum tipo A) a la piel humana in vitro que utiliza células de difusión a través de flujo. Ya que la toxina es de tamaño considerable, la retoma dérmica sin uso de cualquier molécula de transporte se espera por ser insignificante bajo Por lo tanto, una solución portadora se agrega en
15 velocidades diferentes de toxina/portador en un intento de incrementar/facilitar la retoma dérmica a través de la capa estrato córneo. En adición a la cantidad presente en el fluido receptor en varios puntos de tiempo, la distribución en las varias capas de la piel se evalúa después de 24 horas. El producto completo Neuronox® (es decir el complejo toxina/albúmina que incluye proteínas
20 accesorias) se radiomarcán al utilizar ¹²⁵I.

1.1 Sistema de Prueba

Preparación de las membranas de la piel: Las membranas de la piel humana se
25 preparan a partir de muestra de piel congelada (un donante único directamente después de cirugía abdominal). Después de descongelar, la piel se dermatomiza

al utilizar un Dermatoma de 25 mm (Nouvag GmbH, Alemania) a un espesor registrado de aproximadamente 400 μm .

Flujo a través de células de difusión: Las membranas de la piel se colocan en 9 mm de flujo a través de células de difusión automatizadas (PermcGear Inc., Riegelsville, PA, USA). La temperatura de la superficie de la piel se mantiene en aproximadamente 32 °C, en humedad ambiente. El fluido receptor se bombea a una velocidad de aproximadamente 1.6 mL h⁻¹ y que consiste de Solución Salina Amortiguada con Fosfato (PBS) que contiene 0.01 % azida de sodio (p/v).

1.2 Diseño experimental y procedimientos

Etiquetado ¹²⁵I de las sustancias de prueba: Los contenidos de un frasco que contiene el producto Neuronox se reconstituye en 100 μL 50 mM de amortiguador KH₂PO₄, pH 7.2. Durante yodificación 37 MBq Na¹²⁵I (10 μL), 20 μL de una solución de peróxido de hidrógeno diluido aproximadamente 100,000 veces en agua (30 % (v/v) perhidrol) y 20 μL lactoperoxidasa. (4 μg .10 μL -1 agua) se agrega al frasco que contiene el producto Neuronox® después de aproximadamente 60 segundos, se detiene la yodificación mediante la adición de 50 μL de solución de tirosina (1 mg mL⁻¹) en amortiguador de fosfato para remover el exceso de ¹²⁵I que todavía no ha reaccionado con las proteínas disponibles (toxina, albúmina etc.). Después de un minuto, ¹²⁵I (unido a L-tirosina) se separa de las proteínas radioetiquetadas al utilizar una columna Sephadex G25 fina de aproximadamente 10 mL volumen equilibrado con amortiguador de ensayo que contiene 0.5 % (p/v) BSA. Se recolectan fracciones de aproximadamente 250 μL . Se toman subfracciones para medición de radioactividad. Las fracciones se almacenan a 2-10 °C hasta uso adicional.

Diseño experimental: El producto Neuronox® se evalúa por su capacidad de penetrar la piel en soluciones de portador K15RT2. Antes de aplicación del compuesto de prueba, la integridad de la piel se evalúa al determinar el coeficiente de permeabilidad (Kp) de agua tritiada. La configuración experimental es como sigue:

Grupo	n	Velocidad de Portador/toxina	Sustancias de prueba
A	4	Control (sin portador)	NNX solo
B	5	1.1:1	KI5TR2+NNX

Procedimiento de recuperación: Después de 24 horas, las sustancias de prueba sin absorber (dosis desprendible) se remueve del sitio de aplicación que utiliza una solución de jabón suave (3 % Teepol en agua) y hisopos de algodón. La superficie de la piel se seca después de lavado al utilizar hisopos de algodón seco. El compartimiento del receptor y el compartimiento del donante se enjuaga con agua (2 veces 1 mL). Posteriormente, cada membrana de la piel se pela con cinta (10 veces por membrana) al utilizar D-squame (Monaderm, Monaco). El pelado con cinta se discontinua en el caso de ruptura de la epidermis. Las tiras de cinta que contienen (piezas de) la epidermis se agrupan con la membrana de la piel (epidermis). Finalmente, la epidermis y la dermis se separan mecánicamente al utilizar un bisturí y pinzas. La radioactividad en todas las fracciones se mide por el conteo de radiación y.

1.3 **Análisis**

Determinación de la radioactividad: La radioactividad en las muestras de la prueba de integridad se determina mediante conteo de cintillo líquido (LSC) al

66 r

utilizar DOT-DPMTM (técnica de revestimiento digital que utiliza la biblioteca de espectro y el espectro estándar externo) para apagar la corrección en un contador de centelleo Wallac Pharmacia modelo S1414. Los procedimientos de calibración para los instrumentos se establecen en instalaciones de prueba.

5

Formulaciones de dosis: Las alícuotas de la formulación de dosis tomadas justo antes y directamente después de dosificación se agregan directamente al centelleo líquido (Ultima Gold™) y se miden por LSC. Las muestras de fluido de receptor del fluido receptor se agregan directamente al centelleo líquido (Ultima Gold™) y se miden por LSC. La radioactividad en las muestras de la prueba de absorción que utilizan el compuesto de prueba etiquetado ^{125}I se determina al utilizar un Contador Gamma (Perkin Elmer).

10

1.4 Cálculos

15

La absorción total se define como la cantidad de radioactividad relacionada con el compuesto presente en el fluido receptor, el lavado de compartimiento del receptor, y la piel (excluyendo tiras de cinta)

20

2. Resultados

Absorción percutánea del elemento de prueba

La absorción percutánea de [^{125}I]Neuronox®, se evalúa en las membranas de la piel humana. El tiempo de exposición es 24 horas. La distribución (tejido) se presenta en la tabla 1.

25

6f

Tabla 1: Tabla de resumen de la penetración percutánea in vitro de radiactividad asociada con ¹²⁵I en piel humana (expresado como el porcentaje de la dosis aplicada)

Grupo	A		B	
	Media	de	Media	de
Lavado de la piel	111.15	2.10	101.44	3.51
Filtro de carbón	0.01	0.00	0.01	0.00
Estrato córneo	0.76	0.59	2.43	1.43
Epidermis	0.28	0.09	0.30	0.09
Dermis	0.27	0.41	1.03	0.77
Fluido receptor	0.43	0.38	0.93	0.72
Recuperación total	112.94	1.14	106.28	1.52

5

FIG. 1 muestra la penetración percutánea in vitro de radioactividad asociada con ¹²⁵I en piel humana con K15RT2. Los datos claramente muestran que la penetración percutánea in vitro de la radioactividad asociada con ¹²⁵I es mucho mayor con la toxina botulinum más K15RT2, cuando se compara con la toxina botulinum sola.

10

REIVINDICACIONES

Reivindicamos:

- 5 1. Una molécula de transporte para el suministro de una molécula de carga, en donde dicha molécula de transporte comprende un polipéptido de secuencia inversa que tiene una secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO 1.
- 10 2. La molécula de transporte de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido de secuencia inversa se adhiere covalentemente a la molécula de carga.
- 15 3. La molécula de transporte de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido de secuencia inversa se une covalentemente a una estructura cargada positivamente que no se adhiere covalentemente a la molécula de carga.
- 20 4. La molécula de transporte de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el polipéptido de secuencia inversa se une covalentemente a una estructura cargada positivamente que no se une covalentemente a la molécula de carga.
- 25 5. La molécula de transporte de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha molécula de transporte incrementa la penetración de la molécula de carga a través de una membrana biológica.

69

6. La molécula de transporte de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la membrana biológica se encuentra en la piel.

5 7. La molécula de transporte de la reivindicación 1, en donde dicha molécula de transporte incrementa la penetración intracelular de la molécula de carga.

10 8. Un conjugado para el suministro de una molécula de carga, dicho conjugado comprende una molécula de transporte que comprende un polipéptido de secuencia inversa que tiene una secuencia de aminoácido como se establece en la SEQ ID NO. 1; y una molécula de carga.

15 9. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha molécula de transporte se adhiere covalentemente a dicha molécula de carga.

20 10. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha molécula de transporte no se adhiere covalentemente a dicha molécula de carga.

25 11. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha molécula de carga es un agente terapéutico.

12. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicho agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste de péptidos, proteínas, oligonucleótidos, enzimas, y antígenos.

13. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicho agente terapéutico se deriva de un serotipo de toxina botulinum o un fragmento de esta.

5 14. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho agente diagnóstico se selecciona del grupo que consiste de agentes de contraste radiopacos, agentes de contraste paramagnéticos, agentes de contraste superparamagnéticos, y agentes de contraste CT.

10 15. Un método para el tratamiento de una enfermedad, en donde dicho método comprende

seleccionar una molécula de carga;

15 seleccionar una molécula de transporte;

unir dicha molécula de carga a dicha molécula de transporte covalentemente o no covalentemente para formar un conjugado de molécula de carga/molécula de transporte; y

20

administrar dicho conjugado a células objetivo o a una membrana con el fin de originar suministro intracelular o de transmembrana de la molécula de carga.

f1

**MOLÉCULAS DE TRANSPORTE QUE UTILIZAN POLIPÉPTIDOS HIV-TAT DE-
SECUENCIA INVERSA**

RESUMEN

5

Esta invención se relaciona con moléculas de transporte novedosas que comprenden un polipéptido que comprende residuos de aminoácido dispuestos en una secuencia que es la secuencia inversa de la porción básica de la proteína HIV-TAT. Los polipéptidos de transporte novedosos son útiles para el suministro intracelular o de transmembrana de las moléculas de carga, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen polipéptidos y ácidos nucleicos. Los polipéptidos de transporte novedosos se pueden unir covalentemente o no covalentemente a las moléculas de carga.

10

p2

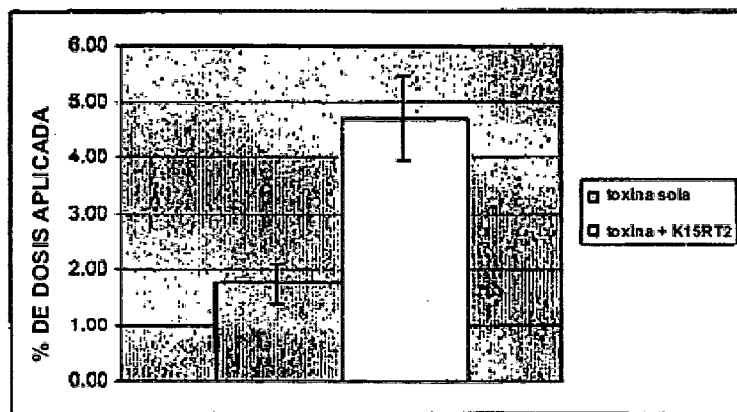


FIGURA 1

73

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Waugh, Jacob M.
Lee, Jae Hoon

<120> Moléculas de Transporte que Utilizan Polipéptidos Hiv-Tat de Secuencia Inversa

<130> 13720-105127

<140> US 11/954,885

<141> 2007-12-12

<150> US 60/882,639

<141> 2006-12-29

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus de inmunodeficiencia humano

<400> 1

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg

1 5

74

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2007/087241

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

ENG, Joseph, D., Jr.
King & Spalding LLP
1185 Avenue of the Americas
New York, NY 10036
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)
16 September 2008 (16.09.2008)

Applicant's or agent's file reference
13720-105127

International application No.
PCT/US2007/087241

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)
12 December 2007 (12.12.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address REVANCE THERAPEUTICS, INC. 2400 Bayshore Parkway Suite 100 Mountain View, California 94043 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address REVANCE THERAPEUTICS, INC. 7555 Gateway Blvd Newark, CA 94560 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:
The request for recording of the above change was received by the International Bureau between 20 and 30 months from the priority date.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned
☒ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Ruby Serge
Facsimile No. +41 22 338 89 95	e-mail pt04.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 04

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 49,147
FECHA : JULIO 7 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-079071- -00000-0000

Fecha: 2009-07-29 16:39:27 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 76

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	RECIBO DE CAJA			49105	07/07/2009	76,380,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

060 15861-891004-3



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

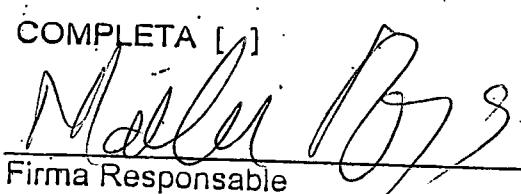
INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐


Firma Responsable

Fecha_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-079071- -00000-0000

Fecha: 2009-07-29 16:39:27 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 76

rrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Commutador: 3 82 08 40

Fax: 350 52 20

E-mail: info@sic.gov.co

www.sic.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA

REFERENCIA	Radicación No.	9 79071
	Solicitud internacional	PCT/US2007/087241
	Fecha inicio fase nacional	29/07/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	9284

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

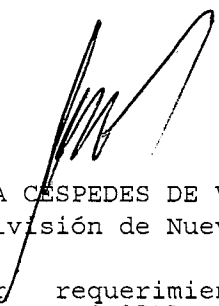
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 9 79071



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 14 AGO. 2008
jfernand