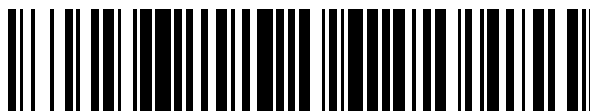


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 491 565**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2009 E 09809913 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2322608**

54 Título: **Agente de transfección**

30 Prioridad:

27.08.2008 JP 2008217958

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.09.2014

73 Titular/es:

**3-D MATRIX, LTD. (50.0%)
3-2-4, Kojimachi Chiyoda-ku
Tokyo 102-0083, JP y
NIPPON MEDICAL SCHOOL FOUNDATION
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**YOSHIDA, DAIZO y
TAKEI, JIRO**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 491 565 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agente de transfección

5 Campo técnico

La presente invención se refiere al uso de un tensioactivo peptídico según la reivindicación 1 y al uso médico de una composición que comprende ARNip y dicho tensioactivo peptídico según la reivindicación 2.

10 Técnica anterior

Se espera que la interferencia por ARN (iARN) se aplique al tratamiento de enfermedad ya que puede inhibir la expresión de genes específicos. En el nivel actual de tecnología, los agentes de transfección usados cuando se transfectan células con ARN de interferencia pequeño (ARNip) consisten principalmente en fosfolípidos catiónicos que se ha indicado que son tóxicos.

Sin embargo, cuando se considera la aplicación del ARNip y otros productos farmacéuticos de ácidos nucleicos en la práctica clínica, se desea que los agentes de transfección tengan una toxicidad tan baja como sea posible y se ha esperado el desarrollo de un agente de transfección que tenga menor toxicidad.

Los tensioactivos peptídicos se conocen por tener una acción que estabiliza proteínas de membrana tales como el receptor acoplado a la proteína G, rodopsina bovina y ser capaces de auto-ensamblarse (documentos no de patente 1 y 2). Sin embargo, su aplicación como agentes de transfección se ha desconocido hasta la fecha.

Documento no de patente 1: Zhao, X. y col., PNAS, vol. 103, N.º: 47, 17707-17712

Documento no de patente 2: Nagai, A. y col., J. Nanosci. Nanotechnol., vol. 7, N.º: 7, 1-7

Von Malzahn y col. (Langmuir, 19:10, pág. 4332-4337) enseñan que péptidos positivamente cargados pueden compactar y encerrar ácidos nucleicos, pero no mencionan la transfección de ARNip en células.

Zhao y col. (Macromol. Biosci., 7, pág. 13-22) desvelan A₆D y sus propiedades físicas, pero no mencionan nada de la administración de ARNip a células.

Yeh y col. (Biochemistry, 44, pág. 16912-16919) desvelan que A₆D y A₆K, también como una mezcla de los mismos, puede estabilizar ciertas enzimas, pero no mencionan la administración de ARNip a células.

Yaghmur y col. (PLOS One, 2, E479) desvelan A₆D y A₆K y estudian su influencia sobre la mezcla de monooleína/agua. Se desvela que estos péptidos experimentan auto-ensamblaje. No se mencionan ácidos nucleicos en este contexto, ni mucho menos ARNip.

Zhao y col. (Trends Biotech., 2004, vol. 22:9, páginas 470-476) desvelan A₆D además de algunos otros tensioactivos peptídicos, que consisten todos en una cabeza cargada, hidrófila y una cola hidrófoba. El documento también menciona pruebas sin publicar; pero no hay mención de A₆D o A₆K en el contexto de administración de ARNip a células.

Zang (Materiales Today, 2003, 6, 20-27) desvela cuatro unidades de construcción peptídicas diseñadas distintas que se consideran útiles para ingeniería molecular; estas incluyen péptidos similares a tensioactivos que tienen siete u ocho residuos de aminoácidos, la cabeza está compuesta por ácidos aspártico y glutámico negativamente cargados o por lisina o histidina positivamente cargadas y la cola consiste en aminoácidos tales como alanina, valina o leucina. El documento menciona simplemente la idea general de que los péptidos tensioactivos se están desarrollando generalmente como sistemas de administración elegidos como diana para, por ejemplo, iARN, pero los péptidos específicos A₆D y A₆K no se desvelan.

Divulgación de la invención**Problemas a resolver por la invención**

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un agente de transfección que tenga menor toxicidad y pueda aplicarse en la práctica clínica.

Como resultado de realizar amplios estudios para resolver los problemas anteriormente mencionados, los autores de la presente invención encontraron que un tensioactivo peptídico es útil como un agente de transfección, conduciendo así a la completitud de la presente invención.

La presente invención se refiere a:

1. El uso de un tensioactivo péptidico que consiste en la secuencia de aminoácidos AAAAAAK para la introducción de ARNip en células, en el que dicho uso no es un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano o animal por cirugía o terapia.

5 2. Una composición que comprende ARNip y un tensioactivo péptidico que consiste en la secuencia de aminoácidos de AAAAAAK para su uso como un medicamento.

3. Una composición que comprende ARNip y un tensioactivo péptidico que consiste en la secuencia de aminoácidos de AAAAAAK para uso en el tratamiento de tumor cerebral, particularmente glioblastoma.

10 Así, la presente divulgación también se refiere a lo siguiente:
 1. un agente de transfección que comprende un tensioactivo péptidico;
 2. el agente de transfección descrito en 1 anteriormente, en el que el tensioactivo peptídico consiste en una porción de cabeza que consiste en 4 a 10 aminoácidos hidrófilos y una porción de cola que consiste en 1 o 2 aminoácidos hidrófobos;
 15 3. el agente de transfección descrito en 1 anteriormente, en el que el tensioactivo peptídico es AAAAAAD o AAAAAAK (en el que AAAAAAD es para referencia); y
 4. una sustancia farmacéutica que comprende el agente de transfección descrito en cualquiera de 1 a 3 anteriores y ácido nucleico.

20 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una gráfica que indica una comparación de citotoxicidad entre un tensioactivo peptídico y agentes de transferencia de genes mediados por liposomas catiónicos (Lipofectamine 2000 y siFECTOR).

25 La FIG. 2 es una gráfica que indica los resultados de un análisis de cambios basados en el tiempo en la cantidad de ARNip introducido en tres tipos de células de glioma maligno humano cultivadas usando un tensioactivo peptídico.

30 La FIG. 3 es una gráfica que indica los resultados de un análisis de la relación entre la concentración de tensioactivo peptídico y la eficiencia de introducción de ARNip.

La FIG. 4 es una gráfica que indica los resultados de confirmar los efectos de interferencia por ARN por ARNip introducido en tres tipos de células de glioma maligno humano cultivadas por tensioactivo peptídico.

35 La FIG. 5 es una gráfica que indica los resultados de confirmar los efectos de interferencia por ARN por ARNip introducido en tres tipos de células de glioma maligno humano cultivadas por tensioactivo peptídico.

40 La FIG. 6 es una gráfica que indica los resultados de confirmar los efectos de interferencia por ARN por ARNip introducido en tres tipos de células de glioma maligno humano cultivadas por tensioactivo peptídico.

En la presente divulgación, un tensioactivo peptídico se refiere al que contiene 6 a 10 residuos de aminoácidos, tiene una longitud de aproximadamente 2 a 3 nm y demuestra propiedades similares a aquellas de tensioactivos convencionales tales como n-dodecil-β-D-maltósido (DM) u octil-D-glucósido (OG).

45 El tensioactivo peptídico de la presente invención consiste preferentemente en una porción de cabeza que consiste en 4 a 10 aminoácidos hidrófilos y una porción de cola que consiste en 1 o 2 aminoácidos hidrófobos.

Más específicamente, los péptidos de referencia desvelados en el presente documento incluyen GGGGDD (G4D2), GGGGGGDD (G6D2), GGGGGGGGDD (G8D2), GGGGGGGGGGDD (G10D2), AAAAAAD (A6D), AAAAAADD (A6D2), AAAAAAKK (A6K2), VVVVVVD (V6D), VVVVVVDD (V6D2), VVVVVVK (V6K), VVVVVVKK (V6K2), LLLLLLD (L6D), LLLLLLDD (L6D2), LLLLLLK (L6K) y LLLLLLKK (L6K2), AAAAAAD (A6D), en particular AAAAAAK (A6K) se usa en la presente invención según se reivindica.

50 El tensioactivo peptídico de la presente invención puede producirse usando un procedimiento de síntesis en fase sólida convencionalmente conocido. Además, péptidos artificialmente sintetizados de este modo pueden usarse preferentemente ya que no contienen sustancias de origen biológico y están libres de riesgo de infección.

En la presente divulgación, un agente de transfección se refiere a una composición usada para introducir un polinucleótido o gen tal como ARNip en células, que puede potenciar la eficiencia de transfección del mismo.

60 El agente de transfección de la presente invención puede incorporarse en productos farmacéuticos con un ácido nucleico deseado. Además, los productos farmacéuticos de la presente invención pueden usarse para administración por vía oral o administración parenteral.

65 Un ácido nucleico usado en la sustancia farmacéutica de la presente invención usa una porción de una secuencia base de genes elegida como diana para su uso en el tratamiento bien tal cual es o bien después de modificarse,

está compuesto por ácido nucleico de ARN y puede regular la función de un gen deseado en el cuerpo. Tales ácidos nucleicos se denominan normalmente medicinas de ácido nucleico. Como referencia, puede usarse el ácido nucleico de ADN.

- 5 Ejemplos de medicinas de ácido nucleico desveladas en el presente documento incluyen medicinas de ácido nucleico de señuelo que inhiben la expresión génica causando que un factor regulador de la transcripción se una a un oligonucleótido que tenga la misma secuencia que una región constante (elemento cis) de ADN intranuclear unido por el factor regulador de la transcripción, aptámeros de ácido nucleico que pueden unirse específicamente con moléculas específicas, ribozimas que tienen actividad catalítica que escinde ARN, ARN antisentido que inhibe la expresión génica uniéndose complementariamente a una región específica de un ARNm de gen diana y ARNip que descompone ARNm que se une a una región específica de ARNm de un gen diana junto con un complejo de silenciamiento inducido por ARN. Las medicinas de ácido nucleico de señuelo, aptámeros de ácido nucleico y ribozimas son ácidos nucleicos que adoptan una estructura tridimensional específica, sofisticada, el ARN antisentido es un oligómero de ARN monocatenario que tiene una secuencia en el lado de la hebra opuesta de una porción de una secuencia de ARNm y el ARNip es un ARN bicatenario corto que tiene la misma secuencia que una porción del ARNm de un gen diana. Estos ácidos nucleicos pueden producirse artificialmente por reacciones químicas usando un sintetizador de ácidos nucleicos, o pueden producirse en células cultivadas usando un vector.

- 20 Aunque los productos farmacéuticos previos eran principalmente compuestos de bajo peso molecular, los productos biofarmacéuticos compuestos de sustancias químicas presentes en el cuerpo están atrayendo actualmente la atención debido a su especificidad por diana y seguridad biológica. Las medicinas de ácido nucleico están incluidas en estos productos biofarmacéuticos y están siendo actualmente desarrolladas por numerosos institutos de investigación y corporaciones farmacéuticas. Entre estas medicinas de ácido nucleico la atención se ha centrado recientemente en los efectos inhibidores de genes específicos de ARNip en particular y están siendo desarrollados productos farmacéuticos de ARNip para diversas enfermedades. El tratamiento de glioblastoma, que es un tipo de tumor cerebral, es un ejemplo de una enfermedad para la que se espera que el uso de ARNip demuestre efectos terapéuticos. En glioblastoma, la apoptosis se induce en células tumorales por iARN dirigida a MMP-2 y se sabe que es eficaz en inhibir el crecimiento tumoral.

- 30 Ejemplos de formas farmacéuticas desveladas en el presente documento incluyen comprimidos, cápsulas, gránulos y jarabes. Estos productos farmacéuticos pueden producirse usando aditivos generalmente usados en la producción de productos farmacéuticos.

- 35 Aunque no hay limitaciones particulares en la dosificación de la sustancia farmacéutica de la presente invención, ella es, por ejemplo, 0,001 a 10 mg/kg de peso corporal por día en el caso de administración parenteral. Esta dosificación puede administrarse una vez al día o dividirse entre dos a tres administraciones por día y puede ajustarse adecuadamente según la edad, patología y síntomas.

- 40 Ejemplos específicos de aditivos incluyen lactosa, dextrina, sacarosa, manitol, almidón de maíz, sorbitol, celulosa microcristalina y polivinilpirrolidona. Estos pueden usarse solos o en una combinación adecuada de los mismos. Estos productos farmacéuticos pueden producirse usando un procedimiento adecuado para la forma de cada sustancia farmacéutica según procedimientos descritos en la farmacopea japonesa. Además, también pueden usarse adecuadamente agentes aromatizantes, colorantes o edulcorantes y similares. El contenido de estos aditivos puede seleccionarse adecuadamente por una persona de con experiencia habitual en la materia.

- 45 Ejemplos de las formas de cuasifármacos desvelados en el presente documento incluyen comprimidos, cápsulas, gránulos, gelatinas y bebidas. Estos cuasifármacos pueden producirse usando aditivos generalmente usados en la producción de cuasifármacos. Además, estos cuasifármacos también pueden contener otros principios activos tales como vitaminas. Además, aditivos tales como edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes o antioxidantes pueden usarse solos o en una combinación adecuada de los mismos. Estos cuasifármacos pueden producirse usando procedimientos conocidos entre personas con experiencia habitual en la materia.

Ejemplo 1

- 55 **Comparación de citotoxicidad de tensioactivo peptídico y agentes de transferencia de genes mediados por liposomas catiónicos**

La citotoxicidad se evaluó usando células humanas cultivadas para un tensioactivo peptídico y dos tipos de agentes de transferencia de genes mediados por liposomas catiónicos actualmente usados ampliamente.

60 <Materiales>

* Sustancias añadidas

- 65 1. Tensioactivo peptídico (secuencia: Ac-AAAAAAK-NH₂, Celtek)
2. Lipofectamine 2000 (Invitrogen)

3. siFECTOR (B-Bridge International, Inc.)

* Células

5 Células de glioma maligno humano cultivadas (U87MG, adquiridas de ATCC)

* Reactivo de ensayo de MTT (para ensayo de proliferación celular)

Kit de ensayo Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation (Promega)

10

<Procedimiento>

Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos según el protocolo de ATCC recomendado (densidad celular: 2×10^4 /pocillo) seguido de incubación durante la noche. El medio se sustituyó con medio fresco y se añadieron las sustancias (concentraciones finales: 0,0005, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 y 500 µg/ml). Las células se cultivaron durante 24 horas. Después de cultivar se añadió Cell Titer 96 Aqueous One Solution (20 µl/pocillo) seguido de medición de la absorción óptica a 495 nm con un lector de placas 4 horas después para cuantificar el número de células viables.

15

20

Como es evidente a partir de la FIG. 1, el tensioactivo peptídico demostró el menor nivel de toxicidad. Los valores de DL50 fueron 285,9 µg/ml para el tensioactivo peptídico, 42,49 µg/ml para Lipofectamine 2000 y 25,3 µg/ml para siFECTOR. El tensioactivo peptídico no demostró citotoxicidad a concentraciones de 25 µg/ml o menos.

Ejemplo 2

25

Confirmación de la introducción de ARNip en células por tensioactivo peptídico

La introducción de ARNip en células por tensioactivo peptídico se confirmó por observación microscópica de ARNip marcado de forma fluorescente.

30

<Materiales>

* Tensioactivo peptídico

35

Secuencia: Ac-AAAAAAK-NH₂ (Celtek)

* ARNip

ARNip/MMP-2 (Santa Cruz)

40

* Reactivo de marcado fluorescente de ARNip

Kit Label IT Cy-3 Labeling (Mirus)

45

* Células

Tres tipos de células de glioma malignas humanas cultivadas (U87MG, T98G, U251MG, cada una adquirida de ATCC)

50

<Procedimiento>

ARNip/MMP-2 se marcó con Cy3 usando el reactivo de marcado fluorescente de ARNip según el protocolo de Mirus. 5000 de las células se sembraron en un vidrio portaobjetos con pocillos según el protocolo de la ATCC y se incubaron durante la noche. Después de eliminar el medio, el ARNip a una concentración final de 50 nM y tensioactivo peptídico a una concentración final de 20 µg/ml se añadieron a 1 ml de medio seguido de cultivo durante 8 horas. En un grupo de control, solo ARNip se cultivó a una concentración final de 50 nM en 1 ml de medio. Las células se observaron con un microscopio de fluorescencia invertido por observación fluorescente con un filtro de Cy3 y por observación de campo brillante.

55

60

<Resultados>

La captación del ARNip marcado con Cy3 se confirmó en el grupo de prueba al que tanto el tensioactivo peptídico como ARNip se añadieron para los tres tipos de células. La captación de ARNip marcado no se observó para ninguna de las células en el grupo de control al que solo se añadió ARNip.

65

Ejemplo 3

Análisis de cambios basados en el tiempo en la cantidad de ARNip introducido en células por tensioactivo peptídico

- 5 Los cambios basados en el tiempo en las cantidades de ARNip introducido en células por tensioactivo peptídico se examinaron por observación microscópica de ARNip marcado de forma fluorescente.

<Materiales>

- 10 * Tensioactivo peptídico

Secuencia: Ac-AAAAAAK-NH₂ (Celtek)

* Concentraciones de tensioactivo peptídico:

- 15 0, 0,5, 1,0, 5,0, 10,0, 20,0, 25,0 µg/ml

* ARNip

- 20 ARNip/MMP-2 (Santa Cruz)

* Reactivo de marcado fluorescente de ARNip

Kit de marcado Label IT Cy-3 (Mirus)

- 25 * Células

Tres tipos de células de glioma malignas humanas cultivadas (U87MG, T98G, U251MG, adquiridas de ATCC)

- 30 **<Procedimiento>**

ARNip/MMP-2 se marcó con Cy3 usando el reactivo de marcado fluorescente de ARNip según el protocolo convencional de Mirus. Después el ARNip marcado se mezcló con el tensioactivo peptídico. ARNip a una concentración final de 50 nM y tensioactivo peptídico a una concentración final de 20 µg/ml se administraron a 1×10^5 células sembradas en una placa de 24 pocillos que contiene medio a 1 ml/pocillo, seguido de incubación durante 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 y 24 horas. Después de lavar los pocillos con PBS, las células se recuperaron y se transfirieron a una placa de 96 pocillos en la que se midieron para absorbancia óptica.

- 40 Los resultados se muestran en la FIG. 2.

* Durante el cultivo durante 1 a 8 horas, las unidades de fluorescencia relativas (UFR) aumentaron casi proporcionalmente y el ARNip se determinó que se incorporaba en las células en proporción al tiempo.

- 45 * Durante el cultivo durante más de 8 horas, los niveles de UFR alcanzaron esencialmente una meseta.

Ejemplo 4

Análisis de la relación entre la concentración de tensioactivo peptídico y la eficiencia de introducción de ARNip

- 50 El modo en el que la eficiencia de introducción de ARNip en células depende de la concentración de tensioactivo peptídico se examinó por observación microscópica de ARNip marcado de forma fluorescente.

<Materiales>

* Tensioactivo peptídico

Secuencia: Ac-AAAAAAK-NH₂ (Celtek)

- 60 * Concentraciones de tensioactivo peptídico:

0, 0,5, 1,0, 5,0, 10,0, 20,0, 25,0 µg/ml

- 65 * ARNip

ARNip/MMP-2 (Santa Cruz)

* Reactivo de marcado fluorescente de ARNip

5 Kit de marcado Label IT Cy-3 (Mirus)

* Células

10 Tres tipos de células de glioma malignas humanas cultivadas
(U87MG, T98G, U251MG, adquiridas de ATCC)

<Procedimiento>

15 ARNip/MMP-2 se marcó con Cy3 usando el reactivo de marcado fluorescente de ARNip según el protocolo convencional de Mirus. Después el ARNip marcado se mezcló con el tensioactivo peptídico. ARNip a una concentración final de 50 nM y tensioactivo peptídico a concentraciones finales de 0, 0,5, 1, 5, 10, 20 y 25 µg/ml se administraron a 1×10^5 células sembradas en una placa de 24 pocillos que contenía medio a 1 ml/pocillo, seguido de cultivo durante 8 horas. Después de lavar los pocillos con PBS, las células se recuperaron y se transfirieron a una placa de 96 pocillos en la que se midieron para absorbancia óptica.

20 Los resultados se muestran en la FIG. 3.

25 * Aunque los aumentos dependientes de la dosis en las URF se debilitaron a 10 µg/ml y por encima en células Y98G, los aumentos en URF en proporción a los aumentos en concentración se observaron para los tres tipos de células y la introducción de ARNip en células se determinó claramente que era dependiente de la concentración de tensioactivo peptídico.

30 * Cuando se consideran junto con los resultados del Ejemplo 3, se determinó claramente que la exposición de células a tensioactivo peptídico a una concentración de 20 µg/ml durante 8 horas producía adecuadamente y significativamente la introducción de ARNip en células.

Ejemplo 5

35 **Confirmación de efectos de interferencia de ARN por ARNip introducido en células usando tensioactivo peptídico**

El ARNip introducido en células por tensioactivo peptídico se confirmó que tenía una capacidad de interferencia de ARN por RT-PCR.

40 <Materiales>

* Tensioactivo peptídico

45 Secuencia: Ac-AAAAAAK-NH₂ (Celtek)

* Células

50 Tres tipos de células de glioma malignas humanas cultivadas
(U87MG, T98G, U251MG, adquiridas de ATCC)

<Procedimiento>

55 Se sembraron 1×10^5 células en una placa de 24 pocillos y se cultivaron durante la noche según el protocolo estándar de ATCC. Después de eliminar el medio, las siguientes disoluciones se añadieron a las concentraciones finales indicadas a continuación seguido de cultivo durante 8 horas en las mismas condiciones de cultivo como se ha descrito previamente.

- (1) Control de blanco (medio solo)
- (2) oligo ARNip al azar (Dharmacon)/tensioactivo peptídico 20 µg/ml
- 60 (3) ARNip 50 nM
- (4) Tensioactivo peptídico 20 µg/ml
- (5) ARNip 50 nM/tensioactivo peptídico 20 µg/ml

65 El ARNip se transcribió de forma inversa a ADNc usando el kit Taqman Gene Expression Cell-to-Ct (Applied Biosystems). El análisis cuantitativo se llevó a cabo usando el sistema de PCR en tiempo real 7500 de Applied Biosystems usando MMP-2 para la diana y beta-actina para el patrón interno por ensayo de la expresión génica

(Applied Biosystems).

Los resultados se muestran en las FIGS. 4 a 6.

5 * La expresión de ARNm de MMP-2 se inhibió significativamente solo en el caso de administración de ARNip 50 nM/tensioactivo peptídico 20 µg/ml.

10 * Como los efectos sobre la introducción en células no están presentes en el caso de ARNip solo, se cree que el ARNip se incorpora en células debido a un efecto de introducción de ARNip de tensioactivo peptídico, produciendo así efectos de interferencia por ARN.

15 * Como la inhibición del gen MMP-2 no se observó en el caso de mezclar tensioactivo peptídico con oligo ARN al azar, que está compuesto por una secuencia para la que no se observa homología en el genoma humano y que no es específico para genes, la reacción se consideró como que no era una reacción no específica que es independiente de la secuencia de ARN.

Listado de secuencias

20 <110> 3-D Matrix, Ltd.

<120> Agente de transfección

<130> FP3220PCT

25 <160> 16

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

30 <211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> péptido sintetizado

<400> 1

Gly Gly Gly Gly Asp Asp
1 5

40 <210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

45 <220>

<223> péptido sintetizado

<400> 2

50 <210> 3

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp Asp

1 5

<210> 3

<211> 10

55 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintetizado

60 <400> 3

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintetizado

<400> 3

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp Asp

1 5 10

<210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido sintetizado

 10 <400> 4

 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp Asp
 1 5 10

 <210> 5
 15 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> péptido sintetizado

 <400> 5

 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Asp
 1 5
 25
 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> péptido sintetizado

 <400> 6
 35
 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Asp Asp
 1 5

 <210> 7
 <211> 7
 40 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido sintetizado
 45
 <400> 7

 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys
 1 5

 50 <210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

 55 <220>
 <223> péptido sintetizado

 <400> 8

 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Lys
 1 5

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> péptido sintetizado
 <400> 9
 10
 Val Val Val Val Val Val Asp
 1 5
 <210> 10
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido sintetizado
 20
 <400> 10
 Val Val Val Val Val Val Asp Asp
 1 5
 25 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> péptido sintetizado
 <400> 11
 Val Val Val Val Val Val Lys
 35 1 5
 <210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido sintetizado
 45 <400> 12
 Val Val Val Val Val Val Lys Lys
 1 5
 <210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> péptido sintetizado
 55 <400> 13
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Asp
 1 5
 60 <210> 14

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> péptido sintetizado
 <400> 14
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Asp Asp
 10 1 5
 <210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido sintetizado
 20 <400> 15
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Lys
 1 5
 <210> 16
 25 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> péptido sintetizado
 <400> 16
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Lys Lys
 1 5
 35

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Uso de un tensioactivo peptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos de AAAAAAK para la introducción de ARNip en células, en el que dicho uso no es un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano o animal por cirugía o terapia.
- 2.- Una composición que comprende ARNip y un tensioactivo peptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos de AAAAAAK para su uso como medicamento.
- 10 3.- Una composición que comprende ARNip y un tensioactivo peptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos de AAAAAAK para su uso en el tratamiento de tumor cerebral.
- 15 4.- La composición de la reivindicación 3 para el uso de la reivindicación 3, en la que el tumor cerebral es glioblastoma.

FIG. 1

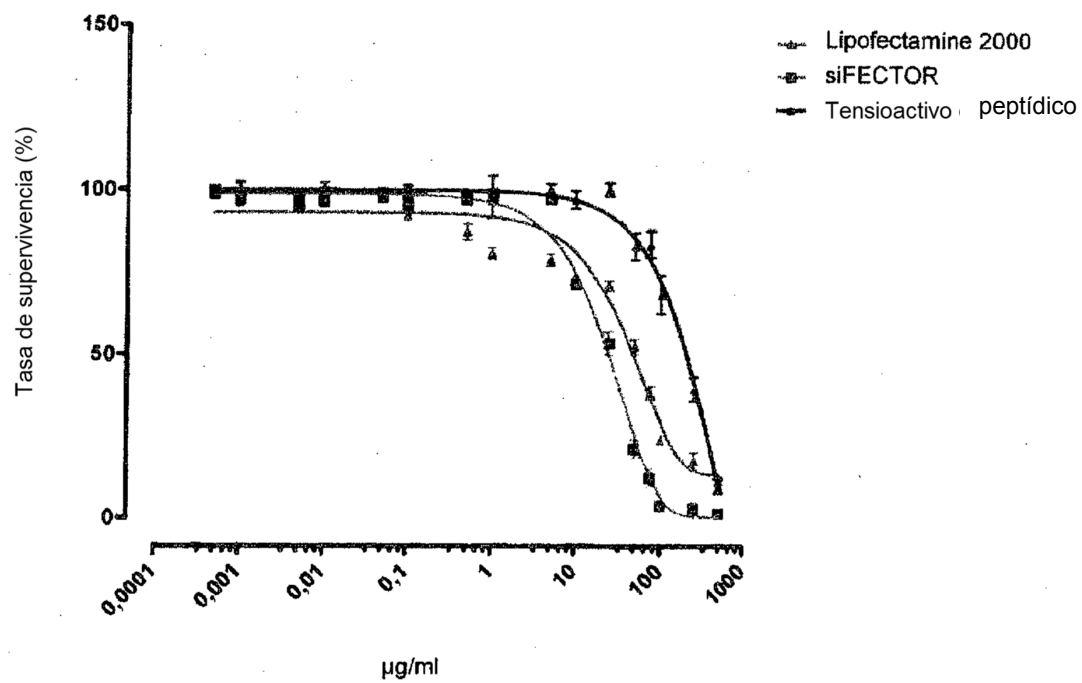


FIG. 2

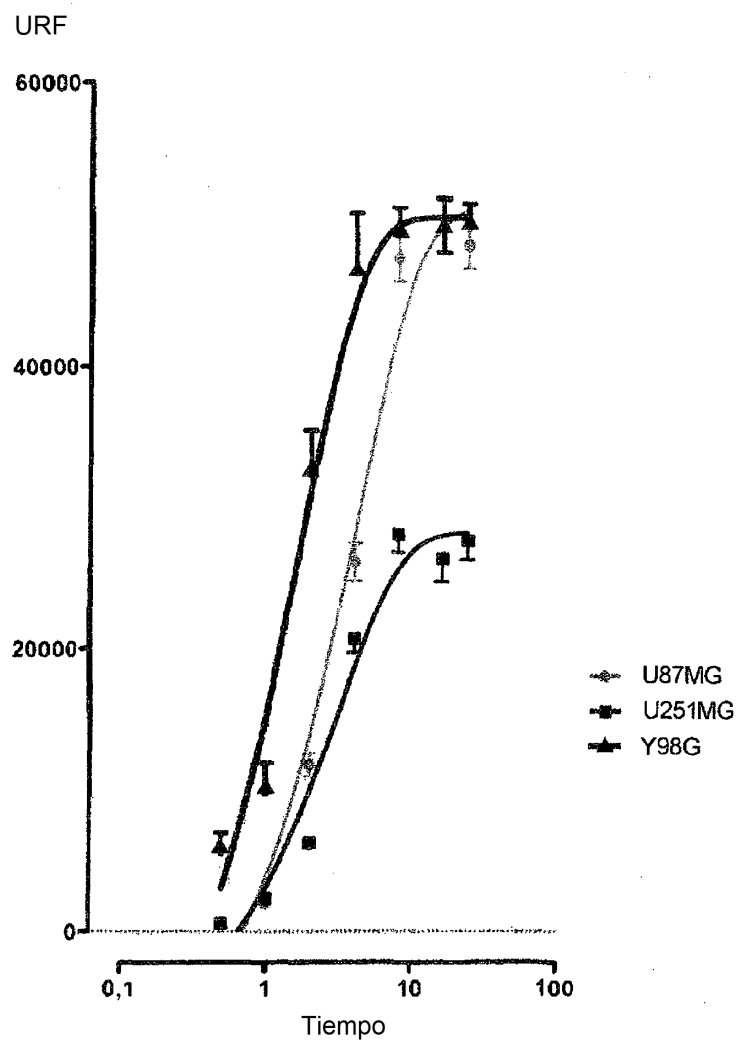


FIG. 3

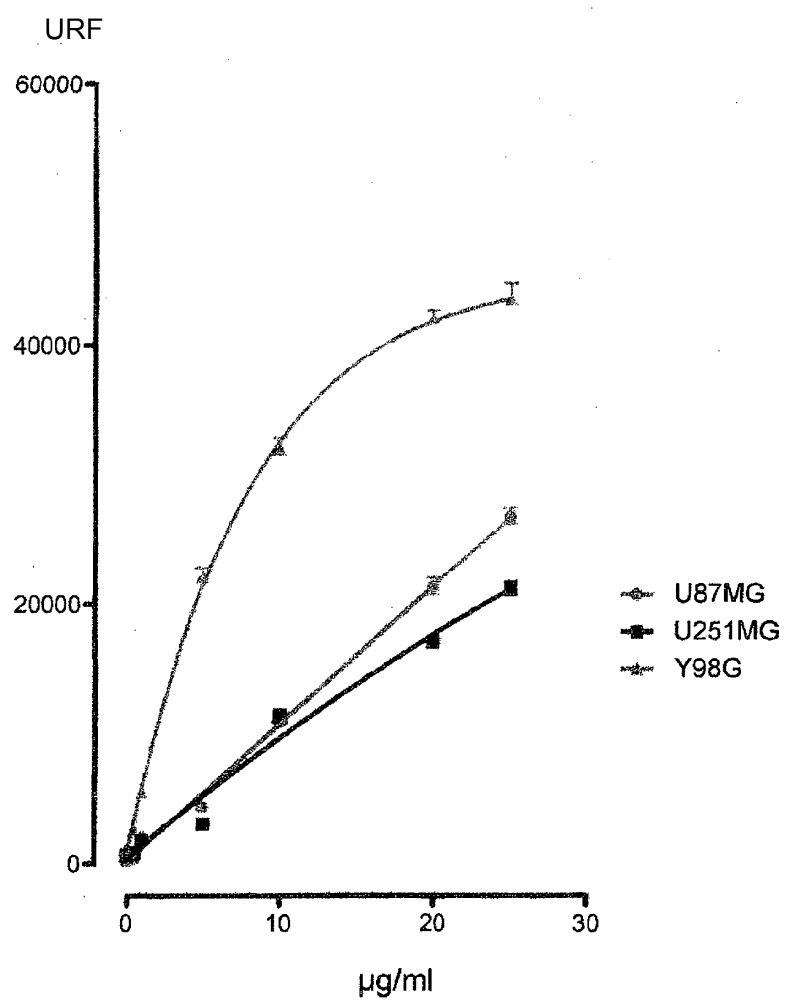


FIG. 4

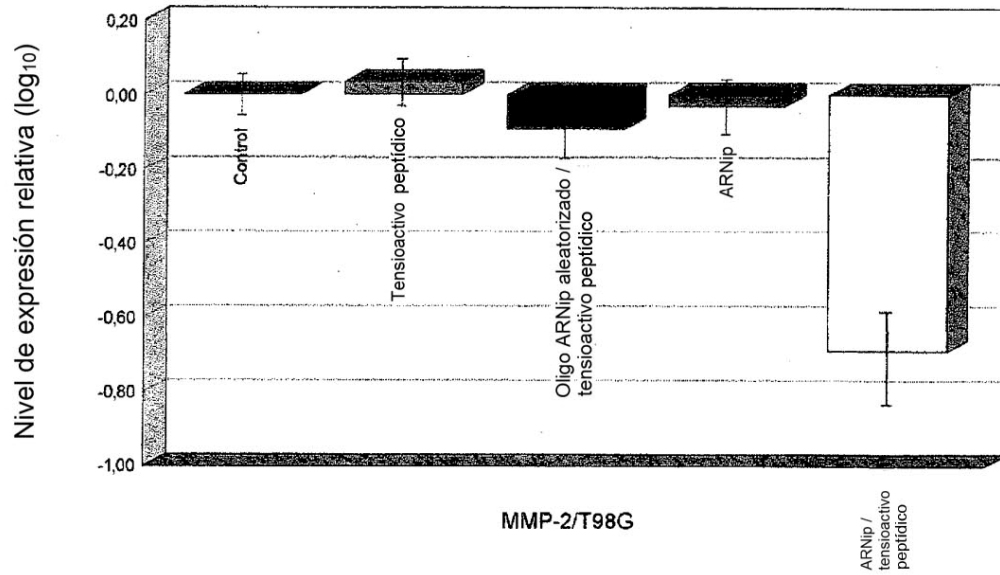


FIG. 5

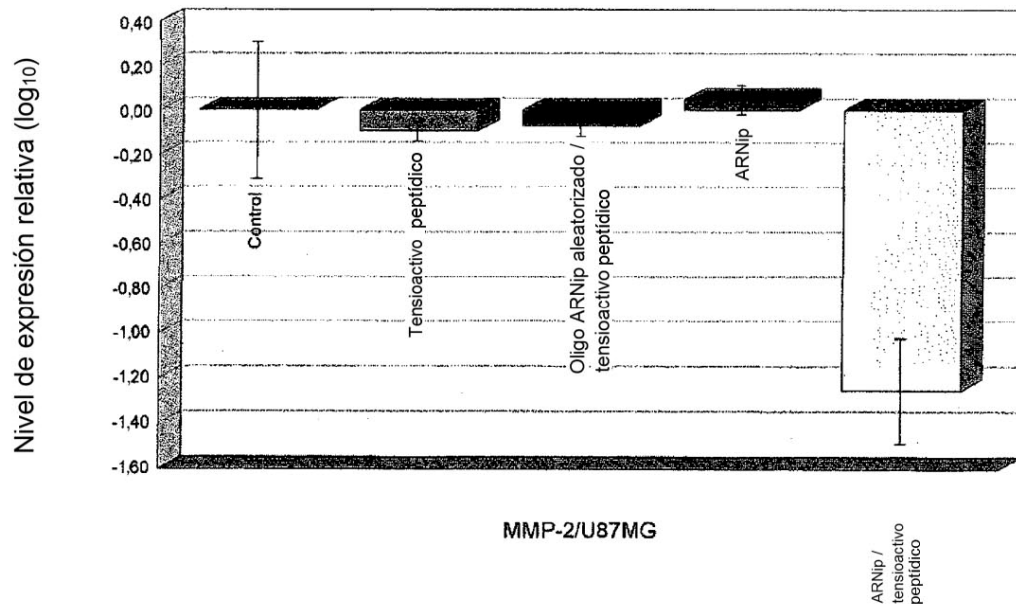


FIG. 6

