

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 779**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.08.2012** **PCT/US2012/052027**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2013** **WO13028843**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2012** **E 12756593 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016** **EP 2748182**

54 Título: **Nanopartículas de péptidos y usos de las mismas**

30 Prioridad:

23.08.2011 US 201161526526 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
03.05.2017

73 Titular/es:

**PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD
COLLEGE (100.0%)
17 Quincy Street
Cambridge, MA 02138, US**

72 Inventor/es:

**DITTRICH, CHRISTIAN y
DANUSER, GAUDENZ**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 610 779 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

Nanopartículas de péptidos y usos de las mismas

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio a tenor de 35 U.S.C §119(e) de la Solicitud Provisional de los EE.UU. N.º 61/526.526, presentada el 23 de agosto de 2011.

10 Campo técnico

La presente invención se refiere a péptidos anfifílicos y partículas que comprenden los péptidos anfifílicos.

Antecedentes

Las nanopartículas son útiles en la estabilización y la entrega de medicamentos: mejoran la solubilidad, prolongan el período de validez, reducen los efectos secundarios y mantienen la exposición al fármaco para un efecto terapéutico prolongado. La matriz utilizada para la entrega dirigida de fármacos por lo general se compone de lípidos, polímeros o metales y se ensamblan en vesículas, micelas o partículas. Véase Torchilin V. (2006) *Adv Drug Deliv.* 58:1532; Stark W (2011) *Angew Chem Int Ed.* 50: 1242; Soussan E et al. (2009) *ACIE.* 48: 274. Las principales variables de partícula independientes que determinan la aplicabilidad in vivo incluyen el tamaño, la carga superficial y la dispersabilidad, que se rige principalmente por el efecto hidrófobo. Nel A et al. (2009) *Nat Matter.* 8: 543. A diferencia de estos vehículos clásicos, es extremadamente difícil diseñar un sistema de entrega coloidal exclusivamente a partir de aminoácidos, principalmente debido a problemas de solubilidad de los péptidos hidrófobos cortos.

La disolución de péptidos hidrófobos es tediosa y por tanto a menudo requiere protocolos elaborados de adición de disolvente [14]. A pesar de todos los esfuerzos, muchos péptidos hidrófobos no son solubles en absoluto y por tanto son difíciles de sintetizar mediante química del grupo de protección Fmoc o Boc: la precipitación del péptido en la fase sólida durante la síntesis conduce a pequeños rendimientos y cantidades predominantes de subproductos.

Sin embargo, una matriz de partículas compuesta de péptidos es deseable, ya que puede degradarse en aminoácidos individuales. Además, a diferencia de otros materiales de matriz, por ejemplo, polímeros, los productos de la síntesis peptídica pueden purificarse hasta el 98 %, evitando la polidispersidad molecular y, por tanto, problemas con la reproducibilidad de las propiedades fisicoquímicas. Adicionalmente, las propiedades de la estructura peptídica pueden modularse fácilmente, por ejemplo, mediante la introducción de mutaciones puntuales de aminoácidos. En consecuencia, todavía existe una fuerte necesidad de obtener por ingeniería un vehículo de fármaco degradable, que pueda sintetizarse y purificarse en un proceso simple.

Dittrich y Meier desvelan la caracterización estructural y la encapsulación de péptidos en nanopartículas sólidas (*Macromolecular Bioscience*, 10: 2010, 1406-1415). Collins et al. desvelan el autoensamblaje de péptidos en nanopartículas esféricas para la entrega de los restos hidrófilos al citosol (*ACS Nano*, 4(5); 2010, 2856-2864). El documento WO2009/109428A2 desvela el autoensamblaje de las nanopartículas de péptidos para su uso como vacunas.

Resumen

Varios aspectos y realizaciones proporcionados en el presente documento se refieren a péptidos anfifílicos, partículas de péptidos que comprenden una o más realizaciones de los péptidos anfifílicos que se describen en el presente documento y usos de los péptidos anfifílicos o las partículas de péptidos que se describen en el presente documento. Las cargas netas de los péptidos anfifílicos que se describen en el presente documento pueden ajustarse mediante el control del número de grupos cargados presentes en restos de aminoácidos de los péptidos anfifílicos, por ejemplo, mediante el enmascaramiento de uno o más grupos amino cargados, por ejemplo, mediante acetilación. Por tanto, los péptidos anfifílicos y las partículas de péptidos que se describen en el presente documento pueden utilizarse como excipientes de entrega o vehículos para diferentes tipos de principios activos, por ejemplo, moléculas cargadas o no cargadas o moléculas polares o no polares. Además, las partículas de péptidos que se describen en el presente documento pueden ajustarse por sus solubilidades, por ejemplo, en una condición fisiológica, mediante el control de las relaciones de dos o más realizaciones de los péptidos anfifílicos presentes en las partículas de péptidos. Por ejemplo, los péptidos anfifílicos totalmente enmascarados (por ejemplo, totalmente acetilados) pueden, en general, formar partículas de péptidos insolubles, mientras que las partículas formadas a partir de péptidos parcialmente enmascarados (por ejemplo, parcialmente acetilados) o no enmascarados (por ejemplo, no acetilados) tienen en general una solubilidad mayor que los péptidos anfifílicos totalmente enmascarados (por ejemplo, totalmente acetilados), por ejemplo, en una condición fisiológica. Por tanto, en algunas realizaciones, la solubilidad de las partículas de péptidos que se describen en el presente documento, por ejemplo, en una condición fisiológica, puede controlarse mediante la formación de las partículas de péptidos con una mezcla de estos péptidos anfifílicos con solubilidades diferentes y variando sus cantidades en las partículas de péptidos en consecuencia. Las partículas de péptidos de la invención y su uso de acuerdo con la invención, se definen en las reivindicaciones.

Un aspecto proporcionado en el presente documento se refiere a un péptido anfifílico comprende un segmento de peptidilo hidrófobo y un segmento de péptido hidrófilo. El inventor ha descubierto que mediante la modulación de la hidrofilia del segmento hidrófilo, se puede controlar el tipo de partícula formada mediante la autoagregación de los péptidos anfifílicos.

En consecuencia, un aspecto de la divulgación proporciona un péptido anfifílico que comprende un segmento de peptidilo hidrófobo y un segmento de peptidilo hidrófilo, en el que el segmento de peptidilo hidrófobo comprende una secuencia de 2 a 10 aminoácidos D y L alternos seleccionados entre alanina, valina, isoleucina, leucina (Leu), fenilalanina, tirosina o triptófano (Trp) y en el que el segmento de peptidilo hidrófilo comprende aminoácidos cargados o no cargados pero polares o derivados de los mismos.

En ciertas realizaciones de este aspecto y todos los demás aspectos que se describen en el presente documento, el segmento de peptidilo hidrófobo puede comprender una secuencia de aminoácidos de $(\text{Trp-Leu})_m-(\text{Trp})_n$ o $(\text{Leu-Trp})_p-(\text{Leu})_q$, en las que cada Trp es D-Trp o L-Trp y cada Leu es D-Leu o L-Leu, m y p son independientemente un número entero de 1 a 20 y n y q son independientemente 0 o 1, a condición de que cuando Trp es D-Trp entonces Leu es L-Leu y cuando Trp es L-Trp entonces Leu es D-Leu o viceversa.

En algunas realizaciones, el segmento de peptidilo hidrófilo puede comprender al menos una carga presente ya sea en el extremo N o un resto de aminoácido. En dichas realizaciones, la al menos una carga puede ser ya sea una carga catiónica o una aniónica. En algunas realizaciones, la al menos una carga catiónica puede estar en un resto de aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Lys, Arg, His y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la al menos una carga aniónica puede estar en un resto de aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Asp o Glu y cualquier combinación de los mismos.

En realizaciones alternativas, el segmento de peptidilo hidrófilo puede comprender aminoácidos no cargados pero polares. En otras realizaciones, el segmento de peptidilo hidrófilo puede comprender al menos una carga y al menos un aminoácido no cargado pero polar. En diversas realizaciones, el al menos un resto de aminoácido no cargado pero polar puede seleccionarse entre el grupo que consiste en Ser, Thr, Asn o Gln y cualquier combinación de los mismos.

En realizaciones particulares de este aspecto y todos los demás aspectos que se describen en el presente documento, el segmento de peptidilo hidrófilo puede comprender una secuencia de aminoácidos de $(\text{Lys})_r$, en la que r es un número entero de 1 a 15. En algunas realizaciones, r puede ser un número entero de 2 a 5. En algunas realizaciones, r puede ser igual a 3.

En algunas realizaciones de este aspecto y todos los demás aspectos que se describen en el presente documento, el segmento de peptidilo hidrófobo puede comprender un polímero. En algunas realizaciones, el enlazador al segmento de peptidilo hidrófobo puede adaptarse para unirse de forma covalente al polímero. En ciertas realizaciones, el polímero puede ser un polímero biocompatible y/o biodegradable. Los ejemplos del polímero incluyen, pero no se limitan a, PEG, PGG, PEO, policaprolactona, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polihidroxialcaboatos, dextranos, polianhídridos, PLA-PGA, poliortoéster, polifumarato, hidrogeles, cualesquier polímeros reconocidos en la técnica como biocompatibles y/o biodegradables y cualquier combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones de este aspecto y todos los demás aspectos que se describen en el presente documento, al menos un grupo amino en el péptido anfifílico puede enmascarse, por ejemplo, mediante acetilación. En dichas realizaciones, el al menos un grupo amino puede ser un grupo amino del extremo N del péptido anfifílico. En otras realizaciones, el al menos un grupo amino puede estar en un resto de Lys del segmento de peptidilo hidrófilo.

En algunas realizaciones de este aspecto y todos los demás aspectos que se describen en el presente documento, todos los grupos amino en el segmento de peptidilo hidrófilo pueden enmascarse, por ejemplo, acetilarse. En otras realizaciones, el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico y al menos uno de los grupos amino en el segmento de peptidilo hidrófilo pueden enmascarse, por ejemplo, acetilarse. En otra realización más, el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico y todos los grupos amino en el segmento de peptidilo hidrófilo pueden enmascarse, por ejemplo, acetilarse. En algunas realizaciones en las que el segmento de peptidilo hidrófilo comprende una secuencia de aminoácidos de $(\text{Lys})_r$, el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico y al menos uno (incluyendo al menos 2, al menos 3 o más) de los restos de Lys del segmento de peptidilo hidrófilo están enmascarados, por ejemplo, acetilados. En una realización en la que el segmento de peptidilo hidrófilo comprende una secuencia de aminoácidos de $(\text{Lys})_r$, el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico y todos los restos de Lys del segmento de peptidilo hidrófilo están enmascarados, por ejemplo, acetilados.

En diversas realizaciones, el segmento de peptidilo hidrófobo puede estar unido al extremo C del segmento de peptidilo hidrófilo.

En ciertas realizaciones, Leu es D-Leu. En algunas realizaciones, Trp es L-Trp. En algunas realizaciones, Lys es L-Lys. En algunas realizaciones, m o p pueden ser, independientemente, entre 1 y 3. En una realización, m o p es 3.

En una realización, n o q es 1. En consecuencia, una realización del péptido anfifílico comprende la secuencia de aminoácidos de (L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp), en la que al menos uno de los restos de L-Lys está acetilado.

- 5 En algunas realizaciones, el péptido anfifílico puede comprender la secuencia de aminoácidos de Ac-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp). En dichas realizaciones, al menos uno de los restos de L-Lys puede estar acetilado.

- 10 En otras realizaciones, el péptido anfifílico puede comprender la secuencia de aminoácidos de Ac-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-X, en la que X está ausente o es NH₂.

El péptido anfifílico puede tener una secuencia de aminoácidos de cualquier longitud. En algunas realizaciones, el péptido anfifílico puede tener una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 restos de aminoácidos.

- 15 El segmento de peptidilo hidrófobo o el segmento de peptidilo hidrófilo del péptido anfifílico pueden modificarse. Por ejemplo, al menos uno de los segmentos de peptidilo hidrófobos o el segmento de peptidilo hidrófilo pueden comprender al menos una mutación puntual. En diversas realizaciones, al menos un enlace amida de la cadena principal puede incluir un enlace de sustitución amida. En otras realizaciones, el péptido anfifílico puede comprender al menos un β-aminoácido, γ-aminoácido o cualquier combinación de los mismos.

- 20 En algunas realizaciones, el péptido anfifílico comprende un segmento de peptidilo hidrófobo y un segmento de peptidilo hidrófilo, en el que el segmento de peptidilo hidrófobo comprende la secuencia de aminoácidos (AA¹¹-AA¹²)_b-(AA¹³)_d, en la que AA¹¹, AA¹² y AA¹³ son restos de aminoácidos hidrófobos seleccionados independientemente para cada aparición, b es un número entero de 1 a 20 y d es 0 o 1, a condición de que AA¹¹ y AA¹² tengan la configuración opuesta (es decir, D y L) y AA¹² y AA¹³ tengan la configuración opuesta (es decir, D y L); el segmento de peptidilo hidrófilo comprende uno o más aminoácidos hidrófilos o derivados de los mismos; y el péptido anfifílico está enmascarado parcial o totalmente.

- 30 En algunas realizaciones, un péptido anfifílico comprende la secuencia de aminoácidos (L-Lys)_r'-((L-Trp)-(D-Leu))_m'-(L-Trp), en la que r' es un número entero de 3-21 y m' es un número entero de 3-20 y en la que al menos uno del grupo amino del extremo N o un grupo amino de cadena lateral de al menos un resto de Lys está conjugado con un grupo protector de nitrógeno o de amino.

- 35 El inventor ha descubierto que algunas realizaciones de los péptidos anfifílicos que se describen en el presente documento pueden tener capacidad de penetración celular. Por tanto, en algunas realizaciones, los péptidos anfifílicos que se describen en el presente documento pueden utilizarse como agentes de penetración y/o transfección celular. En estas realizaciones, los péptidos anfifílicos pueden diseñarse para estar cargados positivamente. En consecuencia, se proporciona en el presente documento un uso de una composición que comprende un péptido anfifílico cargado positivamente como agente de penetración celular o agente de transfección,
- 40 en el que el péptido anfifílico cargado positivamente comprende un segmento de peptidilo hidrófobo y un segmento de peptidilo hidrófilo. El segmento de peptidilo hidrófobo del péptido anfifílico cargado positivamente comprende una secuencia de aminoácidos de (Trp-Leu)_m-(Trp)_n o (Leu-Trp)_p-(Leu)_q, en los que cada Trp es D-Trp o L-Trp y cada Leu es D-Leu o L-Leu, m y p son independientemente un número entero de 1 a 5 y n y q son, independientemente, 0 o 1, a condición de que cuando Trp es D-Trp entonces Leu es L-Leu y cuando Trp es L-Trp entonces Leu es D-Leu o viceversa; mientras que el segmento de peptidilo hidrófilo comprende una secuencia de aminoácidos de (Lys)_r, en la que r es un número entero de 1 a 15. Adicionalmente, en el péptido anfifílico cargado positivamente, al menos uno de los restos de Lys o el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico no están acetilados. En algunas realizaciones, todos los restos de Lys y el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico cargado positivamente no están acetilados.

- 50 En algunas realizaciones, el péptido anfifílico cargado positivamente puede comprender una secuencia de aminoácidos de (L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)=X, en la que X está ausente o es NH₂.

- 55 En algunas realizaciones, la composición puede comprender adicionalmente una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) que se entrega en una célula.

- Adicionalmente, los péptidos anfifílicos que se describen en el presente documento también pueden utilizarse, ya sea solos o como parte de un sistema de entrega para entregar un compuesto de interés, por ejemplo, un principio activo, a una célula. El sistema de entrega puede ser un sistema de entrega dirigida. Los compuestos que se entregan pueden incluir agentes terapéuticos, agentes de diagnóstico y cualquier combinación de los mismos. En consecuencia, un aspecto de la divulgación proporciona un método de uso de un péptido anfifílico como sistema de entrega, comprendiendo el método formar complejos de un principio activo con un péptido anfifílico y poner en contacto una célula con el complejo. En algunas realizaciones, el método puede utilizarse con fines terapéuticos o
- 60 de diagnóstico.

- 65

En otro aspecto, la divulgación proporciona partículas que comprenden un péptido anfifílico que se describe en el presente documento. El inventor ha descubierto, entre otras cosas que las partículas formadas por los péptidos anfifílicos que se describen en el presente documento difieren de las partículas descritas en C. Dittrich, Tesis de doctorado, Universidad de Basilea, 2007. Como aclaración, las partículas fabricadas a partir de los péptidos anfifílicos que se describen en el presente documento son diferentes de las descritas en Dittrich (2007). Los péptidos que se describen en Dittrich (2007) no comprenden grupos amino enmascarados. Como tales, las partículas formadas a partir de dichos péptidos son micelas, por ejemplo, partículas huecas, y no partículas sólidas como se describe en el presente documento. En consecuencia, en ciertas realizaciones, las partículas de péptidos que se describen en el presente documento no son micelas, por ejemplo, partículas huecas. Dicho de otra manera, en ciertas realizaciones, las partículas de péptidos que se describen en el presente documento son partículas sólidas.

En algunas realizaciones, la partícula que comprende un péptido anfifílico que se describe en el presente documento puede comprender además un ligando. En consecuencia, en una realización, una partícula de péptidos que se describe en el presente documento comprende un péptido anfifílico, el péptido anfifílico comprende un segmento de peptidilo hidrófobo y un segmento de peptidilo hidrófilo, en el que el segmento de peptidilo hidrófobo comprende una secuencia de aminoácidos de $(\text{Trp-Leu})_m\text{-(Trp)}_n$ o $(\text{Leu-Trp})_p\text{-(Leu)}_q$, en la que cada Trp es D-Trp o L-Trp y cada Leu es D-Leu o L-Leu, m y p son independientemente un número entero de 1 a 5 y n y q son independientemente 0 o 1, a condición de que cuando Trp es D-Trp entonces Leu es L-Leu, y cuando Trp es L-Trp entonces Leu es D-Leu o viceversa; y en el que el segmento de peptidilo hidrófilo comprende una secuencia de aminoácidos de $(\text{Lys})_r$, en la que r es un número entero de 1 a 15 y en la que la partícula de péptidos comprende además en su superficie exterior un ligando.

En una realización, el ligando puede ser un ligando de receptor de superficie celular o un anticuerpo. Los ligandos de receptor de superficie celular de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, transferrina, EGF, ácido fólico y cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, el ligando puede estar presente en una superficie exterior de la partícula. Por ejemplo, el ligando puede estar adsorbido en la superficie exterior de la partícula que se describe en el presente documento. En realizaciones alternativas, el ligando puede ser unido covalentemente al péptido anfifílico. En una realización, el ligando está unido covalentemente al segmento de peptidilo hidrófilo del péptido anfifílico.

El espesor del ligando presente en la superficie exterior de la partícula que se describe en el presente documento depende, en parte, del tamaño de la molécula de ligando. En algunas realizaciones, el espesor del ligando presente en la superficie exterior de la partícula puede variar de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm. En una realización, el espesor del ligando presente en la superficie exterior de la partícula es de aproximadamente 10 nm. En algunas realizaciones, una relación del ligando a los péptidos anfifílicos puede variar de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:1000000.

El ligando presente en la partícula de péptidos puede seleccionarse basándose en tipos de dianas (por ejemplo, pero no limitadas a, células, bacterias, proteínas y/o ácidos nucleicos) a las que se entregarán las partículas de péptidos. Por ejemplo, para facilitar la entrega de una partícula de péptidos que se describe en el presente documento a una célula, puede seleccionarse un ligando específico para el receptor de la superficie celular. Por tanto, algunas realizaciones de las partículas de péptidos que se describen en el presente documento pueden utilizarse para la entrega dirigida de un principio activo usando las partículas de péptidos como excipientes de entrega o vehículos. En dichas realizaciones, las partículas de péptidos pueden utilizarse para entregar a una célula un principio activo que es impermeable a las células cuando se entrega solo.

En consecuencia, en diversas realizaciones de este aspecto y todos los demás aspectos que se describen en el presente documento, la partícula de péptidos puede comprender uno o más principios activos. En dichas realizaciones, el principio activo puede dispersarse dentro de la partícula. El principio activo puede no tener ninguna carga neta o una carga neta. En algunas realizaciones, el principio activo puede comprender al menos un grupo aromático. Los ejemplos del principio activo incluyen, sin limitaciones, proteínas, péptidos, antígenos, anticuerpos o porciones de los mismos, moléculas similares a anticuerpos, enzimas, ácidos nucleicos, aptámeros, moléculas pequeñas, antibióticos, agentes farmacéuticamente activos, agentes terapéuticos, agentes de contraste y cualquier combinación de los mismos. En una realización, el principio activo es un agente farmacéuticamente activo o un agente terapéutico. En una realización, el principio activo es una molécula de ácido nucleico, incluyendo, pero no limitada a, ARNip, miARN, ARNhc, ADN y cualquier combinación de los mismos. En realizaciones particulares, la relación del principio activo a los péptidos anfifílicos puede variar de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:100.000, de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:10.000, de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:1000, de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:100 o de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:10.

La partícula de péptidos de este aspecto y todos los demás aspectos que se describen en el presente documento puede ser de cualquier tamaño. En algunas realizaciones, la partícula de péptidos puede tener un tamaño de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 5000 nm. En algunas realizaciones, la partícula puede tener un tamaño de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 150 nm.

En algunas realizaciones, la partícula de péptidos puede comprender una mezcla de péptidos anfifílicos totalmente enmascarados (por ejemplo, totalmente acetilados) y parcialmente enmascarados (por ejemplo, parcialmente

acetilados) que se describen en el presente documento. En esas realizaciones, la relación de los péptidos anfifílicos totalmente acetilado a los parcialmente enmascarados puede variar de aproximadamente 95:5 a aproximadamente 1:1. En ciertas realizaciones, la partícula puede comprender adicionalmente péptidos anfifílicos no enmascarados (por ejemplo, no acetilados).

En consecuencia, también se proporciona en el presente documento una partícula de péptidos mixta que comprende un péptido anfifílico totalmente acetilado y un péptido anfifílico parcialmente acetilado o no acetilado. En realizaciones específicas, la partícula de péptidos mixta comprende un primer péptido anfifílico y un segundo péptido anfifílico, en la que el primer y el segundo péptido anfifílico comprenden cada uno, independientemente, un segmento de peptidilo hidrófobo y un segmento de peptidilo hidrófilo, en la que el segmento de peptidilo hidrófobo comprende una secuencia de aminoácidos de $(\text{Trp-Leu})_m-(\text{Trp})_n$ o $(\text{Leu-Trp})_p-(\text{Leu})_q$, en la que cada Trp es D-Trp o L-Trp y cada Leu es D-Leu o L-Leu, m y p son independientemente un número entero de 1 a 5 y n y q son independientemente 0 o 1, a condición de que cuando Trp es D-Trp entonces Leu es L-Leu, y cuando Trp es L-Trp entonces Leu es D-Leu o viceversa; mientras que el segmento de peptidilo hidrófilo comprende una secuencia de aminoácidos de $(\text{Lys})_r$, en la que r es un número entero de 1 a 15. Adicionalmente, el grupo amino del extremo N y todos los restos de Lys de primer péptido anfifílico están acetilados; mientras que al menos el grupo amino del extremo N o uno de los restos de Lys del segundo péptido anfifílico no están acetilados. En algunas realizaciones, ningún grupo amino del extremo N ni los restos de Lys del segundo péptido anfifílico están acetilados.

En realizaciones particulares, el primer y el segundo péptido anfifílico pueden comprender cada uno independientemente una secuencia de aminoácidos de $(\text{L-Lys})-(\text{L-Lys})-(\text{L-Lys})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-\text{X}$, en la que X está ausente o es NH_2 .

La relación del primer péptido anfifílico al segundo péptido anfifílico puede variarse basándose en varios factores, por ejemplo, pero no limitados a, la solubilidad y/o estabilidad de la partícula de péptidos deseable y/o propiedades del principio activo que se va a cargar en la misma. En algunas realizaciones, la relación del primer péptido anfifílico al segundo péptido anfifílico puede estar en un intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1000:1. En otras realizaciones, la relación del primer péptido anfifílico al segundo péptido anfifílico puede estar en un intervalo de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 100:1.

En algunas realizaciones, la partícula de péptidos mixta puede comprender además un principio activo que se describe en el presente documento. El principio activo puede estar presente en la partícula de péptidos mixta en cualquier cantidad, por ejemplo, dependiendo de la capacidad de carga de la partícula de péptidos y/o de la capacidad de unión del primer o el segundo péptido anfifílico. En algunas realizaciones, la relación del principio activo al segundo péptido anfifílico puede estar en un intervalo de aproximadamente 1:1000 a 1:1 o de aproximadamente 1:100 a aproximadamente 1:10. En algunas realizaciones, la relación del principio activo al segundo péptido anfifílico puede estar en un intervalo de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:2.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la presencia del segundo péptido anfifílico en la partícula de péptidos mixta puede proporcionar una carga catiónica para la unión con moléculas de ácido nucleico aniónicas. Por tanto, en algunas realizaciones, el principio activo puede incluir una molécula de ácido nucleico.

En algunas realizaciones, la partícula de péptidos mixta puede comprender adicionalmente en su superficie exterior un ligando. Como se ha descrito anteriormente, la selección de un ligando puede determinarse basándose en una molécula diana (por ejemplo, pero no limitada a, células, bacterias, proteínas, ácidos nucleicos) a la que se unen las partículas de péptidos mixtas. Los ejemplos no limitantes de un ligando pueden incluir un ligando de receptor de superficie celular o una proteína tal como un anticuerpo. En algunas realizaciones, el ligando puede unirse covalentemente a al menos uno del primer y el segundo péptido anfifílico, por ejemplo, el segmento de peptidilo hidrófilo de al menos uno del primer y el segundo péptido anfifílico.

La partícula de péptidos mixta que se describe en el presente documento puede utilizarse para encapsular cualquier principio activo que se describe en el presente documento. En una realización específica, la partícula de péptidos mixta puede utilizarse para encapsular una molécula de ácido nucleico. Por tanto, un aspecto adicional de las invenciones proporciona el uso de una o más realizaciones de la partícula de péptidos mixta que comprende un primer péptido anfifílico y un segundo péptido anfifílico para la entrega de una molécula de ácido nucleico a una célula. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede incluir ARN (por ejemplo, pero no limitado a ARNip, miARN, ARNhc), ADN o cualesquier combinaciones de los mismos.

También se proporcionan en el presente documento composiciones o kits para la fabricación de una o más realizaciones de una partícula de péptidos o una partícula de péptidos mixta. En algunas realizaciones, la composición o kit puede comprender un péptido anfifílico que se describe en el presente documento. El péptido anfifílico proporcionado en la composición o kit puede almacenarse en un recipiente. Dependiendo de la elección de un usuario de que se produzca una partícula de péptidos o partícula mixta que se describen en el presente documento, en algunas realizaciones, la composición o kit puede comprender un primer péptido anfifílico y un segundo péptido anfifílico que se describen en el presente documento. El péptido anfifílico puede proporcionarse en polvo o polvo liofilizado. En algunas realizaciones, la composición o kit puede comprender adicionalmente al menos

un reactivo, por ejemplo, para la reconstitución del péptido anfifílico en polvo, para la emulsión de una mezcla de conjuntos de partículas o ambos. En algunas realizaciones, la composición o kit puede comprender adicionalmente un ligando que se describe en el presente documento, por ejemplo, proporcionado en un recipiente separado. En algunas realizaciones, la composición o kit puede comprender adicionalmente un principio activo que se encapsula en la partícula de péptidos. El principio activo puede proporcionarse en un recipiente separado.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1B muestran los resultados de caracterización de CD3ac purificado de acuerdo con una o más realizaciones de la invención. La Figura 1A muestra un espectro de masas medido en un espectrómetro de masas Orbitrap. La Figura 1B muestra perfiles de elución superpuestos de HPLC-FI de CD3ac y el intermedio síntesis CD3 medidos por absorción a 280 nm. La pureza del producto es superior al 95 % en ambos casos.

Las Figuras 2A-2C muestran imágenes de MEB de nanopartículas de péptido CD3ac de acuerdo con una o más realizaciones de la invención. Las Figuras 2A-2B muestran imágenes de MEB de perlas de CD3ac liofilizado. La Figura 2C muestra una imagen de MEB de una perla de CD3ac, rota en el proceso de liofilización. La imagen revela la propiedad sólida de los precipitados de péptidos.

Las Figuras 3A-3B muestran ajustes lineales de los resultados de dispersión de luz dinámica (DLS). Se determina que tanto la concentración de partículas (Figura 3A) como el ángulo de detección (Figura 3B) influyen de forma diferente en las propiedades de difusión de las perlas de CD3ac en solución acuosa.

La Figura 4 muestra un conjunto de espectros de difracción circular de los derivados de CD3ac CD1, CD2, CD3 y CD4. Los números mostrados son iguales al número de restos de lisina unidos de forma N-terminal.

Las Figuras 5A-5B muestran los efectos de los aminoácidos L únicamente en las propiedades de las nanopartículas de péptidos. La Figura 5A muestra una imagen de MEB de LCD3ac precipitado. No pudo observarse un ensamblaje esférico como se observa en las partículas de CD3ac con LCD3ac precipitado. La Figura 5B muestra espectros de difracción circular de CD3 (línea recta) y LCD3 (línea discontinua), lo que indica las diferencias en la estructura secundaria debido a la quiralidad de los aminoácidos de leucina. LCD3 presenta características alfa-helicoidales.

Las Figuras 6A-6C muestran imágenes de microscopía confocal de perlas de CD3ac coensambladas con rosa de bengala (RB), 5-carboxifluoresceína (CF) o una mezcla de ambos. La Figura 6A muestra imágenes de microscopía confocal de perlas de CD3ac coensambladas con RB. La Figura 6B muestra imágenes de microscopía confocal de perlas de CD3ac coensambladas con CF. La Figura 6C muestra perlas de CD3ac cargadas con RB y CF, indicando la capacidad de las perlas de péptido para encapsular simultáneamente compuestos de alta y baja solubilidad en solución acuosa. Como se muestra en las Figuras 6A-6C, las perlas de CD3ac que contienen RB se observan como esferas individuales, mientras que las perlas que contienen exclusivamente CF tienden a agregarse. En las Figuras 6A-6C, paneles de la parte superior izquierda: emisión de fluorescencia de RB; paneles de la parte inferior derecha: emisión de fluorescencia de CF; paneles de la parte superior derecha: imagen de contraste de fase; y paneles de la parte inferior izquierda: co-localización de ambos canales fluorescentes. La anchura de un panel corresponde a 55 μm .

Las Figuras 7A-7B muestran la eficiencia de encapsulación de la rosa de bengala (RB) en nanopartículas de CD3ac. La Figura 7A muestra los resultados de la eficiencia de coprecipitación de RB con CD3ac. El eje x describe la relación de concentración inicialmente disuelta de CD3ac a RB, antes del cambio del disolvente y el ensamblaje. Eje y izquierdo: composición molar de precipitado (o). Eje y derecho: relación molar de RB encapsulada a RB global (Δ). Como ejemplo, a una relación inicial de RB:CD3ac = 1:4, aproximadamente el 15 % en moles de las perlas consisten en RB y aproximadamente el 33 % de la RB inicialmente disuelta se encapsuló en los ensamblajes. La Figura 7B muestra la absorción de triptófano del sedimento ($\blacktriangle$) y fracciones de sobrenadante ($\bullet$) que contienen diferentes cantidades de RB, lo que indica que el ensamblaje de CD3ac no se ve afectado por concentraciones equimolares de carga de RB.

Las Figuras 8A-8I muestran los resultados de la caracterización de las partículas de péptido CD3ac ensambladas en presencia de transferrina marcada con AF568 (Tfn-AF568) y Flutax-2 y transferrina (Tfn). Las Figuras 8A-8C muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de fluorescencia roja (Figura 8A) y verde (Figura 8B) de partículas de péptidos antes de la tripsinización. La imagen fusionada (Figura 8C) muestra la distribución de fluorescencia diferencial para Tfn-AF-568 (anillo) y Flutax-2 (distribuido equitativamente). Las Figuras 8D-8F muestran imágenes fluorescentes de la misma muestra después de la tripsinización durante 6 horas. El anillo característico de la fluorescencia de Tfn-AF-568 desapareció (Figura 8D) y la intensidad de emisión de Flutax-2 aumentó en un factor de 13,5 (Figura 8E). Las Figuras 8G-8H muestran un perfil de nivel de gris promediado de $n = 10$ partículas en el canal rojo (Figura 8G) y verde (Figura 8H) antes y después de la tripsinización. La Figura 8I muestra un diagrama esquemático de partículas de péptidos CD3ac con una corona de proteínas (por ejemplo, Tfn-AF568) antes y después de la tripsinización.

Las Figuras 9A-9D muestran los resultados de composiciones de Flutax-2 y Tfn-AF568 dentro de las nanopartículas de péptido CD3ac. Las Figuras 9A y 9B muestran la composición cuantificada de partículas de péptidos autoensambladas con Tfn-AF568 (Figura 9A) y Flutax-2 (Figura 9B), respectivamente. El eje x describe la relación de concentración de Tfn-AF568 o Flutax-2 inicialmente disueltos a CD3ac (123 μM), antes del cambio del disolvente y el ensamblaje. Eje y izquierdo (símbolos abiertos): composición molar de las nanopartículas de péptidos (PNP, del inglés *peptide nanoparticles*). Eje y derecho (símbolos cerrados): relación molar de Tfn-AF568 o Flutax-2 encapsulados a Tfn-AF568 o Flutax-2 globales. A modo de ejemplo en la Figura 9B, en una relación inicial de Flutax-2:CD3ac = 0,1, aproximadamente el 7,5 % en moles de un PNP consiste en Flutax-2 y

aproximadamente el 80 % del Flutax-2 inicialmente disuelto se encapsuló. La eficiencia de encapsulación uniforme de Flutax-2 de aproximadamente el 80 % corresponde a un coeficiente de partición logarítmica de 5,25. La Figura 9C muestra la distribución de la intensidad de fluorescencia de Tfn-AF568 de las PNP antes y después de la competencia con Tfn. Las partículas se ensamblaron en presencia de 10 µg/ml de Tfn-568 y la imagen se formó inmediatamente después de la formación. Las barras negras corresponden a la distribución de intensidad de los puntos de fluorescencia resultantes. La distribución representada por barras grises describe las intensidades de fluorescencia de las mismas PNP después de un período de incubación de 24 horas a 37 °C en presencia de 1360 µg/ml de Tfn. La Figura 9D muestra un gráfico de datos acumulativos de distribución de la intensidad de fluorescencia de Tfn-AF568 de las PNP antes y después de la competencia con Tfn como se muestra en la Figura 9C.

Las Figuras 10A-10K muestran el control del diámetro de las partículas y la caracterización de la morfología de las nanopartículas por MEB. Las Figuras 10A-10C muestran la fluorescencia de Tfn-AF568 sobre partículas de péptidos ensamblados a partir de CD3ac 492 µM, 246 µM y 123 µM. Las barras de escala corresponden a 1 µm. La Figura 10D muestra tres perfiles de intensidad de fluorescencia superpuestos, cada uno de los cuales muestra los resultados promedio de 10 partículas. Los resultados se representan por la media +/- la desviación típica. La Figura 10E muestra una interpretación esquemática de perfiles de intensidad que ilustran la relación del tamaño de partícula, la fluorescencia de la corona y la resolución limitada de la microscopía óptica. Las Figuras 10F-10I muestran imágenes de MEB con tinción negativa de las partículas de CD3ac ensambladas en ausencia (Figura 10F-10G) y presencia (figuras, 10H-10I) de Tfn 10 µg/ml. Las muestras que contienen proteína (por ejemplo, que contienen Tfn) muestras pueden distinguirse por una capa de contraste intermedio alrededor de las partículas de péptidos. Los agujeros ocasionales (indicados por la flecha negro) fueron el resultado del vacío aplicado en la MEB y se ha descrito una observación similar en Hyuk I. et al, (2005) *Nat Matter* 4: 671. Las Figuras 10J-10K muestran que el tamaño de partícula final depende de la presencia de Tfn durante el ensamblaje. La formación de partículas en ausencia de Tfn-AF568 da como resultado un diámetro medio de partícula de 100 nm (Figura 10J) donde la presencia de la proteína durante el ensamblaje de las partículas reduce el diámetro a 51 nm (Figura 10K). El espesor de la corona de proteína corresponde a 9,0 +/- 2,1 nm (recuadro de la Figura 10K).

Las Figuras 11A-11H muestran efectos de la competencia de Tfn sobre la unión de $PNP^{Tfn-AF568}_{Flutax-2}$ a las células CHO. $PNP^{Tfn-AF568}_{Flutax-2}$ se usa en el presente documento como un acrónimo para las nanopartículas de péptido CD3ac autoensambladas en presencia de carga (por ejemplo, el Flutax-2 utilizado en el presente documento) y corona (por ejemplo, el Tfn-AF568 utilizado en el presente documento). Las Figuras 11A-11C muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de células CHO incubadas con $PNP^{Tfn-AF568}_{Flutax-2}$ durante una hora. La co-localización de puntos fluorescentes en el canal verde (Flutax-2) y el rojo (Tfn-AF568) indica la identidad de las partículas, que se acumulan en las células.

Las figuras 11D-11F muestran células CHO incubadas con $PNP^{Tfn-AF568}_{Flutax-2}$ durante una hora en presencia de Tfn 17 µM. La asociación de PNP se reduce significativamente. Las barras de escala corresponden a 10 µm. La Figura 11G muestra el recuento promedio de nanopartículas péptido (PNP) cuenta por célula (por ejemplo, CHO o TRVb). El valor para el control negativo (CN) corresponde a puntos falsos positivos de fluorescencia en las células CHO incubadas en ausencia de $PNP^{Tfn-AF568}_{Flutax-2}$ pero por lo demás idénticas concentraciones de Tfn-AF568 y Flutax-2. Los resultados son la media +/- e.t.m., el doble asterisco indica $P < 10^{-9}$, Kolmogorov-Smirnov. La Figura 11H muestra una serie de imágenes que muestran las células CHO después de 1 hora de incubación con $PNP^{Tfn-AF568}_{Flutax-2}$. Las células de la fila superior y las células de la fila inferior se incubaron en ausencia y en presencia de Tfn 17 µM, respectivamente. El área perfilada en un cuadrado blanco se aumenta en las Figuras 11A-11F. Las barras de escala corresponden a 20 µm.

Las Figuras 12A-12M muestran resultados experimentales de internalización de nanopartículas. Las Figuras 12A-12D muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de células CHO incubadas con $PNP^{Tfn-AF568}_{Flutax-2}$ durante 1 hora. La Figura 12E muestra distribuciones de fluorescencia de Flutax-2/Tfn-AF568 de $PNP^{Tfn-AF568}_{Flutax-2}$ (V/R) después de 1 hora de incubación de las células CHO con $PNP^{Tfn-AF568}_{Flutax-2}$. Las barras grises representan V/R en el portaobjetos de vidrio, las barras negras corresponden a V/R encontrada dentro del perímetro de la célula. La Figura 12F muestra el esquema de asociación de las partículas y la internalización después de 1 hora. Las Figuras 12G-12J muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de células CHO incubadas con $PNP^{Tfn-AF568}_{Flutax-2}$ durante 6 horas, en las que el desplazamiento de las partículas hacia valores de V/R más altos sirve como un sustituto de la internalización de las partículas. La Figura 12K muestra que la distribución de los valores de V/R se incrementó significativamente después de un período de incubación más largo (barras negras). Por el contrario, la distribución de los valores de V/R en el portaobjetos de vidrio (barras grises) es estadísticamente indistinguible de los valores de V/R de la misma subpoblación después de 1 hora. La Figura 12L muestra el esquema de asociación de las partículas y la internalización después de 6 horas. Para las partículas en los compartimentos lisosómicos, la corona se digiere proteolíticamente proporcionando una fluorescencia de Tfn-AF568 disminuida y una fluorescencia de Flutax-2 aumentada. La Figura 12M muestra imágenes que indican el cambio de color de $PNP^{Tfn-AF568}_{Flutax-2}$. La fila superior muestra las células CHO incubadas

$PNP^{Tfn-AF568}_{Flutax-2}$ durante 1 hora y contrasta con la fila inferior, donde la misma estirpe celular se incubó con $PNP^{Tfn-AF568}_{Flutax-2}$ durante 6 horas. El área perfilada en un cuadrado blanco se aumenta en las Figuras 12A-12D y 12G-12J. Las barras de escala corresponden a 20 μm .

Las Figuras 13A-13I muestran la liberación de la carga después de la incubación con $PNP^{Tfn-AF568}_{Flutax-2}$ durante 24 horas. Las Figuras 13A-13C muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de células CHO incubadas durante 24 horas con Flutax-2 67 nM y Tfn-AF568 0,09 $\mu g/ml$. Las Figuras 13D-13G muestran imágenes de fluorescencia de células CHO incubadas durante 24 horas con la misma cantidad de Flutax-2 y Tfn-AF568 autoensambladas con CD3ac para formar $PNP^{Tfn-AF568}_{Flutax-2}$. La Figura 13H muestra la intensidad de fluorescencia promedio de Flutax-2 dependiente de la célula línea (CHO, TRV_B) y la competencia con Tfn disuelto, sin marcar. El control negativo (CN) corresponde a la autofluorescencia celular en el canal verde. Los resultados son la media $\pm$ e.t.m, un solo asterisco indica $P < 0,01$, el doble asterisco indica $P < 10^{-9}$, Kolmogorov-Smirnov. Las barras de escala corresponden a 10 μm . La Figura 13I muestra imágenes de células CHO después de 24 horas de incubación con Flutax-2. Ambas muestras (la fila superior y la inferior) contienen Flutax-2 66,7 nM. La fila superior muestra un cultivo de células incubadas con Flutax-2 disuelto en el medio de cultivo celular, la fila inferior de la misma estirpe celular se incubada con Flutax-2 previamente autoensamblada en $PNP^{Tfn-AF568}_{Flutax-2}$. El área perfilada en un cuadrado blanco se aumenta en las Figuras 13A-13G. Las barras de escala corresponden a 20 μm .

La Figura 14 muestra un conjunto de imágenes de microscopía de fluorescencia de partículas de péptidos (por ejemplo, CD3ac) ensambladas con Flutax-2 y Tfn-AF568. La fila superior muestra la muestra antes de la tripsinización. El canal rojo y el verde no son congruentes ya que las partículas dispersas se mueven y hay un retardo de tiempo entre las imágenes provocado por el cambio de filtros de excitación y emisión. Partículas idénticas se establecen entre paréntesis y se superponen en las Figuras 8A-8F. La fila inferior muestra la misma muestra después de 6 horas de incubación con tripsina. La corona roja desaparece y las partículas restantes se adhieren a la superficie del cubreobjetos de vidrio.

Las Figuras 15A-15B muestran curvas de calibración de fluorescencia de Tfn-AF568 (Figura 15A) y Flutax-2 (Figura 15B). Ambos medidos en una solución de H₂O al 60 %, DMSO al 30 %, FBS al 10 %. El disolvente orgánico se requiere para disolver las nanopartículas en la fracción de sedimento y la presencia de FBS minimiza la adsorción de analitos marcados a superficies de plástico, proporcionando la linealidad entre la concentración de fluoróforo y la fluorescencia medida.

Las Figuras 16A-16B muestran una nanopartícula de péptidos de acuerdo con una o más realizaciones de la invención. La Figura 16A muestra un diagrama esquemático de una partícula de CD3ac funcionalizada con moléculas de EGF, que puede estar opcionalmente marcada con Rojo Texas (con fines de visualización). La Figura 16B es un conjunto de imágenes fluorescentes que muestran las partículas CD3ac funcionalizadas con EGF captadas por las células.

Las Figuras 17A-17K muestran resultados experimentales de células (por ejemplo, células HeLa) tratadas con una realización de las nanopartículas de péptido encapsuladas con nocodazol (que es un agente químico que puede despolimerizar los microtúbulos y utilizarse como un agente antineoplásico). La Figura 17A muestra una representación esquemática de cuatro condiciones experimentales diferentes, en la que PB1e representa nanopartículas de CD3ac funcionalizadas con EGF encapsuladas con nocodazol 20 μM y los resultados experimentales se muestran en las Figuras 17B-17F. La Figura 17B muestra un conjunto de imágenes fluorescentes que muestran las estructuras de los microtúbulos de las células después de 1 hora de incubación en las condiciones indicadas en la Figura 17A. Las señales fluorescentes rojas dentro de las células indican las nanopartículas de PB1e captadas por las células. La Figura 17C muestra un conjunto de imágenes fluorescentes que muestran nanopartículas de PB1e captadas por las células después de diversos períodos de tiempo como se indica. Las Figuras 17D-17F muestran imágenes fluorescentes de estructuras microtubulares de células HeLa tratadas en diferentes condiciones como se indica. La Figura 17G muestra una representación esquemática de cuatro condiciones experimentales diferentes, en la que PB1e representa nanopartículas de CD3ac funcionalizadas con EGF encapsuladas con nocodazol 40 μM y los resultados experimentales se muestran en las Figuras 17H-17K. Las Figuras 17H-17I muestran imágenes de las células después de 4 horas de incubación en condiciones diferentes como se indica. La Figura 17I muestra imágenes fluorescentes de estructuras microtubulares (indicadas en verde) de las células en diferentes condiciones. Las señales rojas dentro de las células indican las nanopartículas de PB1e captadas por las células. Las Figuras 17J-17K muestran imágenes de las células después de 24 horas de incubación en condiciones diferentes como se indica. La Figura 17K muestra imágenes fluorescentes de estructuras microtubulares (indicadas en verde) de las células en diferentes condiciones. Las señales rojas dentro de las células indican las nanopartículas de PB1e captadas por las células. Las Figuras 18A-18C muestran otra realización de las nanopartículas de péptidos de acuerdo con la invención, en la que las nanopartículas de CD3ac están funcionalizados con un anticuerpo. La Figura 18A muestra representaciones esquemáticas de las nanopartículas de CD3ac funcionalizadas con anticuerpos primarios o secundarios. La Figura 18B muestra que las nanopartículas de CD3ac funcionalizadas con IgG de conejo anti-transferrina pueden unirse a la transferrina (marcada con A568) y por tanto se muestran como puntos brillantes en la derecha de la figura. La Figura 18C muestra que las nanopartículas de CD3ac funcionalizados con IgG de conejo anti-transferrina pueden unirse a IgG anti-conejo (marcado con Alexa555) y por tanto se muestran como puntos brillantes en la derecha de la figura.

Las Figuras 19A-19B muestran imágenes fluorescentes de las nanopartículas de péptido no acetiladas (CD3) para su uso como agente de transfección *in vitro*. La Figura 19A muestra que las partículas de CD3 pueden usarse para entregar oligonucleótidos dentro de las células. La Figura 19B no muestra ninguna transfección celular con oligonucleótidos en ausencia de partículas de CD3.

Las Figuras 20A-20B muestran la eficiencia de encapsulación de oligonucleótidos en partículas de péptidos no acetilados. La Figura 20A es un conjunto de imágenes en el transcurso del tiempo que muestran la migración de oligonucleótidos y proteínas a través de un gel de agarosa durante la electroforesis. En la Figura 20A, la calle superior se cargó con una mezcla que contenía péptidos CD3 -21 μM (H-LK-LK-LK-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH₂)⁴⁺, ADNmc ~5,4 μM (5'-TTGTGCCGCCTTTGCAGGTGTATC-3')²⁴⁻, AF488-ADNmc ~0,24 μM (AF488-5'-TTGTGCCGCCTTTGCAGGTGTATC-3')²⁴⁻ y Tfn-AF568 ~4,14 $\mu\text{g/ml}$, mientras que la calle inferior (control) estaba cargada con una mezcla similar, pero sin péptidos CD3. Después de la electroforesis de aproximadamente 40 min, el exceso de ADNmc y Tfn migraron a través del gel de agarosa hacia el ánodo, mientras que las partículas de péptidos formadas en la zona de carga del gel de agarosa (como se evidencia por la co-localización de la señal de AF488 y la señal de fluorescencia de AF568) no eran capaces de migrar en el gel de agarosa debido a su mayor tamaño. La Figura 20B es un conjunto de datos de cromatografía HP-WAX (intercambio aniónico débil) que muestran que la mayoría de los péptidos CD3 y ADNmc se encapsularon en partículas de péptidos (sedimento) y un poco permaneció en el sobrenadante. Máximo a ~1,5 min: péptidos CD3; Máximos a ~14,5 min y ~15 min: ADNmc separó y parcialmente hibridado, respectivamente.

La Figura 21 es una imagen microscópica fluorescente que muestra la captación de partículas de péptidos que contienen ácido nucleico por las células HeLa. En esta realización, las partículas de péptidos se forman a partir de una mezcla que comprende péptidos CD3, péptidos CD3ac, oligonucleótidos (por ejemplo, ADNmc) y transferrina. La co-localización de la señal de fluorescencia de ADNmc-AF488 con las partículas de péptidos (como se indica por la fluorescencia de transferrina-AF568, donde la transferrina se forma en la superficie exterior de la partícula) indica la estabilidad de las partículas de péptidos en una condición fisiológica y la capacidad de dichas partículas de péptidos para entregar moléculas de ácidos nucleicos u oligonucleótidos a las células.

Las Figuras 22A-22D muestran los datos de estabilidad de las partículas de péptidos que contienen ADNmc en suero (por ejemplo, suero al ~10 %) y la eficiencia de la transfección celular usando las partículas de péptidos. La Figura 22A muestra que la estabilidad de las partículas PNP1 (partículas de péptidos CD3 que contienen ADNmc) en agua depende de la temperatura y más partículas PNP1 tienden a disociarse a una temperatura más alta. La Figura 22B muestra los datos de estabilidad para un estudio en el transcurso del tiempo de las partículas PNP1 en agua, lo que indica que la estabilidad de las partículas PNP1 en agua es dependiente de la temperatura y las partículas PNP1 tienden a disociarse más rápido a una temperatura superior, por ejemplo, a una temperatura más alta que 4 °C. La Figura 22C es un conjunto de imágenes fluorescentes que muestra células HeLa incubadas en presencia de partículas PNP1 o partículas PNP2 (partículas de péptidos CD3/CD3ac que contienen ADNmc) a temperaturas de aproximadamente 4 °C y aproximadamente 37 °C. Los paneles superiores de la Figura 22C muestran que se detectó una señal de fluorescencia de Tfn-AF568 difusa y más fuerte en el citosol cuando las células se incubaron con las partículas PNP1 a aproximadamente 37 °C, en comparación con una fluorescencia de Tfn-AF568 más punteada detectada en las células incubadas a aproximadamente 4 °C. Sin embargo, este contraste no se observó en las células incubadas con las partículas PNP2, como se muestra en los paneles inferiores de la Figura 22C. En lugar de ello, los paneles inferiores de la Figura 22C muestran que se observaron señales de fluorescencia de Tfn-AF568 punteados y comparables tanto en las células incubadas a aproximadamente 4°C como a aproximadamente 37 °C, en presencia de las partículas PNP2. Estos resultados indican que las partículas PNP1 tienden a disociarse en suero (por ejemplo, suero al ~10 %) a aproximadamente 37 °C; mientras que las partículas PNP2 parecen ser más estables en suero (por ejemplo, ~10 % de suero) a aproximadamente 37 °C durante al menos aproximadamente 30 minutos. La Figura 22D es una imagen fluorescente de células de control negativo (es decir, células HeLa incubadas en presencia de ADNmc sin partículas PNP1 o PNP2 o péptidos correspondientes), indicando que se observa una intensidad de fluorescencia de AF488-ADNmc mucho más baja en el control negativo que la de las células incubadas con las partículas PNP1 o PNP2.

Descripción detallada de la invención

Diversos aspectos y realizaciones proporcionados en el presente documento se refieren a péptidos anfífilos, partículas de péptidos que comprenden una o más realizaciones de los péptidos anfífilos que se describen en el presente documento y usos de los péptidos anfífilos o partículas de péptidos que se describen en el presente documento. Las cargas netas de los péptidos anfífilos que se describen en el presente documento pueden ajustarse mediante el control del número de grupos cargados presentes en restos de aminoácidos de los péptidos anfífilos, por ejemplo, mediante el enmascaramiento de uno o más grupos amino cargados, por ejemplo, mediante acetilación. Por tanto, los péptidos anfífilos y partículas de péptidos que se describen en el presente documento pueden utilizarse como excipientes de entrega o vehículos para diferentes tipos de principios activos, por ejemplo, moléculas cargadas o no cargadas o moléculas polares o no polares. Además, las partículas de péptidos que se describen en el presente documento pueden ajustarse por sus solubilidades, por ejemplo, en una condición fisiológica, mediante el control de las relaciones de dos o más realizaciones de los péptidos anfífilos presentes en las partículas de péptidos. Por ejemplo, los péptidos anfífilos totalmente enmascarados (por ejemplo, totalmente acetilados) en general pueden formar partículas de péptidos insolubles, mientras que las partículas formadas a partir

péptidos parcialmente enmascarados (por ejemplo, parcialmente acetilados) o no enmascarados (por ejemplo, no acetilados) en general tienen una solubilidad mayor (o menor estabilidad) que los péptidos anfífilos completamente enmascarados (por ejemplo, totalmente acetilados), por ejemplo, en una condición fisiológica. Por tanto, en algunas realizaciones, la solubilidad o la estabilidad de las partículas de péptidos que se describen en el presente documento, por ejemplo, en una condición fisiológica, pueden controlarse, por ejemplo, mediante la formación de partículas de péptidos con una mezcla de péptidos anfífilos con solubilidades diferentes y variando sus cantidades en las partículas de péptidos en consecuencia. En consecuencia, la versatilidad y la estabilidad de los péptidos anfífilos y partículas de péptidos que se describen en el presente documento pueden adaptarse para diversas aplicaciones, por ejemplo, la entrega de fármacos y/o la liberación sostenida de un principio activo.

Por el término "estabilidad" o "estable" utilizado en el presente documento se entiende una capacidad de una partícula de péptidos de conservar su volumen original (por ejemplo, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o más de su volumen original) durante un período de tiempo, por ejemplo, al menos aproximadamente 30 minutos o más (incluyendo al menos aproximadamente 1 hora, al menos aproximadamente 3 horas, al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 12 horas, al menos aproximadamente 24 horas o más), en una condición especificada, por ejemplo, una condición fisiológica. La estabilidad de una partícula de péptidos puede, en parte, estar gobernada por su solubilidad en una condición especificada. Cuanto más soluble es una partícula de péptidos en una condición especificada, menos estable es la partícula de péptidos en la condición especificada. En una realización, el término "estabilidad" o "estable", como se usa en el presente documento, se refiere a una partícula de péptidos que es insoluble en una condición especificada, por ejemplo, en un medio acuoso a una temperatura especificada. En algunas realizaciones, el medio acuoso es agua. En algunas realizaciones, el medio acuoso es un medio fisiológico, por ejemplo, con una cierta concentración de sal, pH y/o concentración de proteína/suero.

En un aspecto, se proporciona en el presente documento un péptido anfífilo que comprende un segmento de peptidilo hidrófobo y un segmento de péptido hidrófilo. El inventor ha descubierto entre otras cosas que, mediante la modulación de la hidrofilia de un resto de aminoácido hidrófilo de un péptido anfífilo, la anfifilia del péptido anfífilo puede modularse de manera que inesperadamente conduce al autoensamblaje de los péptidos en partículas sólidas. La anfifilia puede modularse mediante la conjugación de un grupo hidrófilo con un aminoácido en el segmento de peptidilo hidrófilo o enmascarando un grupo hidrófilo en el segmento de peptidilo hidrófilo o enmascarando el grupo amino del extremo N del péptido anfífilo. Por ejemplo, cuando el aminoácido hidrófilo es un aminoácido cargado, la hidrofilia puede modularse mediante la conjugación de la parte cargada de la molécula con un grupo protector. En consecuencia, en algunas realizaciones, al menos un grupo amino en el péptido anfífilo se conjuga con un o grupo protector de nitrógeno o de amino.

En algunas realizaciones, el péptido anfífilo está completamente enmascarado. Como se usa en el presente documento, un péptido totalmente enmascarado se refiere a un péptido anfífilo en el que el grupo amino del extremo N y todos los grupos amino de la cadena lateral en el segmento de peptidilo hidrófilo se conjugan con un grupo protector de nitrógeno o de amino.

En algunas realizaciones, el péptido anfífilo está enmascarado parcialmente. Como se usa en el presente documento, un péptido parcialmente enmascarado se refiere a un péptido anfífilo en el que uno o más de los grupos amino del extremo N o los grupos amino de la cadena lateral en el segmento de peptidilo hidrófilo no están conjugados con un nitrógeno o grupo protector de amino; sin embargo, el péptido anfífilo aún comprende al menos un grupo amino conjugado con un grupo protector de nitrógeno o de amino.

Como se usa en el presente documento, un "grupo protector de nitrógeno" o un "grupo protector de amino" se refiere a restos que bloquean o enmascaran el grupo NH_2 . Los grupos protectores de amino de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, grupos protectores de carbamato, tales como 2-trimetilsililetoxicarbonilo (Teoc), 1-metil-1-(4-bifenilil)etoxicarbonilo (Bpoc), t-butoxicarbonilo (BOC), aliloxicarbonilo (Alloc), 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) y benciloxicarbonilo (Cbz); grupos protectores de amida, tales como formilo, acetilo, trihaloacetilo, benzoilo y nitrofenilacetilo; grupos protectores de sulfonamidas, tales como 2-nitrobencenosulfonilo; y grupos protectores de imina y cíclicos de imida, tales como ftalimido y ditiassuccinilo. Se describen otros grupos protectores de amino, así como otros grupos protectores representativos, en Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Capítulo 2, 2ª ed., John Wiley & Sons, Nueva York, 1991 y *Oligonucleotides And Analogues A Practical Approach*, Ekstein, F. Ed., IRL Press, NY, 1991.

En algunas realizaciones, el grupo protector de nitrógeno o de amino es acilo o alquilo, por ejemplo, acetilo, etanoilo, propionilo, t-butanoilo, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo o hexanoilo.

En algunas realizaciones, el grupo amino del extremo N de un péptido anfífilo se conjuga con un grupo protector de nitrógeno o de amino.

En algunas realizaciones, al menos un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) grupo amino de la cadena lateral de un aminoácido del péptido anfífilo se conjuga con un grupo protector de nitrógeno o de amino. El

aminoácido cuyo grupo amino de la cadena lateral ha de conjugarse puede estar presente en cualquier posición en el péptido anfifílico. Los aminoácidos con la cadena lateral conjugada pueden estar presentes uno junto al otro o no estar uno junto al otro. Cuando tres o más aminoácidos de cadena lateral conjugada están presentes algunos de los aminoácidos de cadena lateral pueden estar presentes junto a otro aminoácido de cadena lateral conjugada mientras que algunos de los aminoácidos de cadena lateral conjugada no están junto a otro aminoácido de cadena lateral conjugada. Además, cuando dos o más grupos protectores de nitrógeno o de amino están presentes, pueden ser todos iguales o todos diferentes o cualquier combinación de los mismos y diferentes.

En algunas realizaciones, al menos un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) grupo amino de cadena lateral de un aminoácido en el segmento de peptidilo hidrófilo se conjuga con un grupo protector de nitrógeno o de amino. Sin limitaciones, el aminoácido de cadena lateral conjugada puede estar presente en cualquier posición del segmento de peptidilo hidrófilo. Por ejemplo, leyendo desde el extremo N, en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y así sucesivamente del segmento de peptidilo hidrófilo.

En algunas realizaciones, el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico y al menos un grupo amino de cadena lateral (incluyendo, por ejemplo, al menos uno, al menos dos, al menos tres o más grupos amino de cadena lateral) en el segmento de peptidilo hidrófilo del péptido anfifílico se conjuga con un grupo protector de nitrógeno o de amino. En algunas realizaciones, el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico y al menos un grupo amino de cadena lateral (incluyendo, por ejemplo, al menos uno, al menos dos, al menos tres o más grupos amino de cadena lateral) en el segmento de peptidilo hidrófilo del péptido anfifílico está acetilado.

En algunas realizaciones, el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico y todos los grupos amino de cadena lateral en el segmento de peptidilo hidrófilo del péptido anfifílico se conjugan con un grupo protector de nitrógeno o de amino. En algunas realizaciones, el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico y todos los grupos amino de cadena lateral en el segmento de peptidilo hidrófilo del péptido anfifílico están acetilados.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la presencia de un grupo protector de nitrógeno o de amino en el péptido anfifílico modula la hidrofiliia del péptido anfifílico. Por tanto, la naturaleza anfifílica del péptido anfifílico puede ajustarse mediante la variación del número de grupos protectores de nitrógeno o de amino en el péptido anfifílico.

El péptido anfifílico puede tener una secuencia de aminoácidos de cualquier longitud. En algunas realizaciones, el péptido anfifílico puede tener una longitud de aproximadamente 5 a 25 restos de aminoácidos. En una realización, el péptido anfifílico tiene una longitud de 10 restos de aminoácidos.

Segmento de peptidilo hidrófobo

Como se usa en el presente documento, la expresión "segmento de peptidilo hidrófobo" se refiere a un segmento de peptidilo que tiene un contenido relativamente alto de aminoácido hidrófobo. Por ejemplo, un segmento de peptidilo hidrófobo se refiere a un segmento de peptidilo, en el que al menos aproximadamente el 50 % o más (incluyendo al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o más) de los restos de aminoácidos son restos de aminoácidos hidrófobos. En una realización, un segmento de peptidilo hidrófobo es un segmento de peptidilo, en el que todos los aminoácidos son aminoácidos hidrófobos.

En consecuencia, en algunas realizaciones, el segmento de peptidilo hidrófobo comprende la secuencia de aminoácidos $(AA^{11}-AA^{12})_b-(AA^{13})_d$, en la que AA^{11} , AA^{12} y AA^{13} se seleccionan independientemente entre restos de aminoácidos hidrófobos para cada aparición, b es un número entero de 1 a 20 y d es 0 o 1, a condición de que AA^{11} y AA^{12} tengan la configuración (es decir, D y L) opuesta y AA^{12} y AA^{13} tengan la configuración opuesta. Por ejemplo, si los aminoácidos representados por AA^{11} tienen la configuración D entonces los aminoácidos representados por AA^{12} tienen la configuración L y AA^{13} , si está presente, tiene la configuración D. Como alternativa, si los aminoácidos representados por AA^{11} tienen la configuración L entonces los aminoácidos representados por AA^{12} tienen la configuración D y AA^{13} , si está presente, tiene la configuración L.

En algunas realizaciones, el segmento de peptidilo hidrófobo comprende una secuencia de 2 a 10 aminoácidos D y L alternos seleccionados entre el grupo que consiste en alanina, valina, isoleucina, leucina (Leu), fenilalanina, tirosina, triptófano (Trp) y cualesquier combinaciones de los mismos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "aminoácido hidrófobo" se refiere a un aminoácido que muestra una hidrofobia mayor que cero de acuerdo con la escala de hidrofobia de consenso normalizada de Eisenberg, 1984, *J. Mol. Biol.* 179: 125-142 (1984). Los aminoácidos hidrófobos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp, Pro, Met, Gly y sus derivados.

En algunas realizaciones, un aminoácido hidrófobo es un aminoácido aromático. Como se usa en el presente documento, la expresión "aminoácido aromático" se refiere a un aminoácido hidrófobo con una cadena lateral que tiene al menos un anillo aromático o heteroaromático. El anillo aromático o heteroaromático puede contener uno o más sustituyentes tales como -OH, -SH, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -NO₂, -NO, -NH₂, -NHR, -NRR, -C(O)R, -C(O)OH, -

C(O)OR, -C(O)NH₂, -C(O)NHR, -C(O)NRR y similares donde cada R es independientemente alquilo (C1-C6), alquilo (C2-C6) sustituido, alqueno (C2-C6), alqueno (C2-C6) sustituido, alquino (C2-C6), alquino (C2-C6) sustituido, arilo (C5-C20), arilo (C5-C20) sustituido, alcarilo (C6-C26), alcarilo (C6-C26) sustituido, heteroarilo de 5-20 miembros, heteroarilo de 5-20 miembros sustituido, alquilheteroarilo de 6-26 miembros o alquilheteroarilo de 6-26 miembros sustituido. Los aminoácidos aromáticos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, Phe, Tyr y Trp.

En algunas realizaciones, un aminoácido hidrófobo es un aminoácido alifático. Como se usa en el presente documento, la expresión "aminoácido alifático" se refiere a un aminoácido hidrófobo que tiene una cadena lateral hidrocarbonada alifática. Los aminoácidos alifáticos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, Ala, Val, Leu e Ile.

En algunas realizaciones, un aminoácido hidrófobo es un aminoácido no polar. Como se usa en el presente documento, la expresión "aminoácido no polar" se refiere a un aminoácido hidrófobo que tiene una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico y que tiene enlaces en los que el par de electrones compartido en común por dos átomos generalmente se sostiene equitativamente por cada uno de los dos átomos (es decir, la cadena lateral no es polar). Los aminoácidos no polares de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, Leu, Val, Ile, Met, Gly y Ala.

Como se apreciará por los expertos en la materia, las categorías de aminoácidos que se describen en el presente documento no son mutuamente excluyentes. Por tanto, las cadenas laterales de aminoácidos que presentan dos o más propiedades fisicoquímicas pueden incluirse en múltiples categorías. Por ejemplo, las cadenas laterales de aminoácidos que tienen restos aromáticos que están sustituidos adicionalmente con sustituyentes polares, tales como Tyr, pueden presentar tanto propiedades hidrófobas aromáticas como propiedades polares o hidrófilas y por tanto pueden incluirse tanto en las categorías de aromáticos como en la de polares. La categorización apropiada de cualquier aminoácido será evidente para los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

En algunas realizaciones, para cada aparición AA¹¹, AA¹² y AA¹³ se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en Pro, Ile, Phe, Val, Leu, Trp, Met, Ala, Gly, Tyr y cualquier combinación de los mismos.

Sin limitación, todos los AA¹¹ y AA¹² puede ser iguales, todos diferentes o cualquier combinación de iguales y diferentes. En consecuencia, en algunas realizaciones, todos los AA¹¹ son iguales. En algunas realizaciones, todos los AA¹² son iguales. En algunas realizaciones, todos los AA¹¹ son iguales, todos los AA¹² son iguales y AA¹¹ es diferente de AA¹².

En algunas realizaciones, al menos uno de AA¹¹, AA¹² y AA¹³ no es Tyr o Leu.

En algunas realizaciones, al menos un AA¹¹ no es Tyr.

En algunas realizaciones, al menos uno de AA¹² no es Leu.

En algunas realizaciones, AA¹³ no es Tyr o Leu.

En algunas realizaciones, AA¹¹ es Tyr.

En algunas realizaciones, AA¹² es Leu.

En algunas realizaciones, el segmento de peptidilo hidrófobo comprende una secuencia de aminoácidos (Trp-Leu)_m-(Trp)_n o (Leu-Trp)_p-(Leu)_q, en la que m y p son independientemente un número entero de 3 a 20 y n y q son independientemente 0 o 1. Cada Trp puede ser D-Trp o L-Trp y cada Leu puede ser D-Leu o L-Leu. Cuando Trp es D-Trp, entonces Leu es L-Leu y cuando Trp es L-Trp, entonces Leu es D-Leu. De forma similar, cuando Leu es L-Leu, entonces Trp es D-Trp y cuando Leu es D-Leu, entonces Trp es L-Trp.

En alguna realización, m y p son independientemente un número entero de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15. En algunas realizaciones, m y p son independientemente un entero de 1 a 5 (por ejemplo, un número entero de 1, 2, 3, 4 o 5). En algunas realizaciones, m o p es un número entero de 1, 2 o 3. En una realización, m o p es un número entero de 3.

En una realización, el segmento de peptidilo hidrófobo comprende una secuencia de aminoácidos ((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp).

Segmento de peptidilo hidrófilo

Como se usa en el presente documento, la expresión "segmento de peptidilo hidrófilo" se refiere a un segmento de peptidilo que tiene propiedades de hidrofilia relativas a un resto hidrocarbonado. En algunas realizaciones, el segmento de peptidilo hidrófilo se refiere a un segmento de peptidilo que tiene propiedades de hidrofilia en relación con el segmento de peptidilo hidrófobo de un péptido anfifílico que se describe en el presente documento. En general, el segmento de peptidilo hidrófilo comprende al menos un aminoácido hidrófilo. Como se usa en el presente

documento, la expresión "aminoácido hidrófilo" se refiere a un resto de aminoácido que muestra una hidrofobia menor que cero de acuerdo con la escala de hidrofobia de consenso normalizada de Eisenberg et al., *J. Mol. Biol.* 179: 125-142 (1984). Los aminoácidos hidrófilos ejemplo incluyen, pero no se limitan a Lys, Arg, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln y derivados de los mismos.

5 En algunas realizaciones, el aminoácido hidrófilo es un aminoácido cargado o no cargado. Como se usa en el presente documento, la expresión "aminoácido cargado" se refiere a un resto de aminoácido que tiene una carga neta. De acuerdo con ello, un aminoácido cargado puede ser un aminoácido catiónico o un aminoácido aniónico. Como se usa en el presente documento, la expresión "aminoácido no cargado" se refiere a un resto de aminoácido
10 que no tiene carga neta. Un resto de aminoácido cargado puede modificarse a un aminoácido no cargado, mediante el enmascaramiento de la carga del aminoácido, por ejemplo, mediante la conjugación de un grupo protector a un átomo que transporta carga. En una realización, un resto de aminoácido cargado puede modificarse en un aminoácido no cargado mediante acetilación.

15 En algunas realizaciones, el aminoácido hidrófilo es un aminoácido polar. Como se usa en el presente documento, la expresión "aminoácido polar" se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene una cadena lateral que está cargada o no cargada a pH fisiológico, pero que tiene al menos un enlace en el que el par de electrones compartidos en común por dos átomos se sostiene más estrechamente por uno de los átomos. Los aminoácidos polares de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, Asn, Gln, Ser, Thr y cualquier combinación de los mismos.

20 En algunas realizaciones, el aminoácido hidrófilo es un aminoácido polar cargado o no cargado.

En algunas realizaciones, el aminoácido hidrófilo es un aminoácido catiónico. Como se usa en el presente documento, la expresión "aminoácido catiónico" se refiere a un resto de aminoácido que comprende una cadena lateral cargada positivamente en condiciones fisiológicas normales. Por tanto, la expresión "aminoácido catiónico" incluye cualquier aminoácido de origen natural o mimético que tiene por tanto una cadena lateral cargada positivamente en condiciones fisiológicas normales. En general, los restos de aminoácidos que comprenden un grupo amino en su cadena lateral variable se consideran como aminoácidos catiónicos. Los aminoácidos catiónicos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, lisina, histidina, arginina, hidroxilisina, ornitina y los respectivos derivados, análogos y configuraciones estereoisoméricas de los mismos.

En algunas realizaciones, el aminoácido hidrófilo es un aminoácido aniónico. Como se usa en el presente documento, la expresión "aminoácido aniónico" se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene una carga negativa. Los aminoácidos aniónicos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, Glu, Asp y derivados de los mismos.

35 En algunas realizaciones, el aminoácido hidrófilo es un aminoácido ácido. Como se usa en el presente documento, la expresión "aminoácido ácido" se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene un valor de pK de la cadena lateral de menos de 7. Los aminoácidos ácidos normalmente tienen cadenas laterales cargadas negativamente a pH fisiológico debido a la pérdida de un ion hidrógeno. Los aminoácidos ácidos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, Glu, Asp y derivados de los mismos.

En algunas realizaciones, el aminoácido hidrófilo es un aminoácido básico. Como se usa en el presente documento; la expresión "aminoácido básico" se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene un valor de pK de la cadena lateral de más de 7. Los aminoácidos básicos normalmente tienen cadenas laterales cargadas positivamente a pH fisiológico debido a la asociación con el ion hidronio. Los aminoácidos básicos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, His, Arg, Lys y derivados de los mismos.

50 En algunas realizaciones, el segmento de peptidilo hidrófilo comprende al menos un aminoácido cargado o al menos un aminoácido polar no cargado o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el segmento de peptidilo hidrófilo comprende al menos un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp y Glu o al menos un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Ser, Thr, Asn y Gln o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el segmento de peptidilo hidrófilo puede comprender un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Lys, Arg y His.

55 En algunas realizaciones, al menos un grupo amino en el segmento de peptidilo hidrófilo está enmascarado o conjugado con un grupo protector de nitrógeno o de amino.

En algunas realizaciones, el segmento de peptidilo hidrófilo comprende la secuencia de aminoácidos (AA²¹)_f, en la que AA²¹ es un aminoácido hidrófilo seleccionado independientemente para cada caso y f es un número entero de 1 a 21.

60 Sin limitaciones, todos los AA²¹ puede ser iguales, todos diferentes o cualquier combinación de los mismos y diferentes.

65 En algunas realizaciones, f es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15.

En algunas realizaciones, el segmento de peptidilo hidrófilo comprende una secuencia de aminoácidos (Lys)_r, donde r es un número entero de 1 a 15. En algunas realizaciones, r es un número entero de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15. En algunas realizaciones, r es un número entero de 2 a 5 (por ejemplo, r es un número entero de 2, 3, 4 o 5). En una realización, r es un número entero de 3.

En algunas realizaciones, el segmento de peptidilo hidrófilo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en (L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys), (L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys(Ac)), (L-Lys)-(L-Lys(Ac))-(L-Lys), (L-Lys(Ac))-(L-Lys)-(L-Lys), (L-Lys)-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac)), (L-Lys(Ac))-(L-Lys)-(L-Lys(Ac)), (L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Lys), L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac)), y cualquier combinación de los mismos, donde "Ac" se refiere a la acetilación del resto de aminoácido Lys.

En algunas realizaciones, el segmento de péptido hidrófilo incluye o es un polímero hidrófilo. Como se usa en el presente documento, la expresión "polímero hidrófilo" se refiere a un polímero que tiene propiedades de hidrofilia relativas a un resto hidrocarbonado. En algunas realizaciones, la expresión "polímero hidrófilo" se refiere a un polímero que tiene propiedades de hidrofilia en relación con el segmento de peptidilo hidrófobo de un péptido anfifílico que se describe en el presente documento. La hidrofilia de un polímero puede determinarse, por ejemplo, mediante el ensayo ASTM D570. En general, los polímeros hidrófilos son hidrosolubles. Los polímeros hidrófilos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), poli(propilenglicol), poli(óxido de etileno-co-óxido de propileno), ácido hialurónico, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), heparina, polivinil(pirrolidona), sulfato de condroitano, quitosano, glucosaminoglicanos, dextrano, dextrina, sulfato de dextrano, acetato de celulosa, carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, celulósicos, poli(trimetilenglicol), poli(tetrametilenglicol), polipéptidos, poli(acrilamida), poli(acrilamida), poli(etilamina), poli(alilamina) y mezclas de los mismos.

Modificaciones de péptidos de ejemplo

En algunas realizaciones, un péptido anfifílico que se describe en el presente documento pueden comprender al menos un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más) aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en alanina; arginina; asparragina; ácido aspártico; cisteína; ácido glutámico; glutamina; glicina; histidina; isoleucina; leucina; lisina; metionina; fenilalanina; prolina; serina; treonina; triptófano; tirosina; valina; homocisteína; fosfoserina; fosfotreonina; fosfotirosina; hidroxiprolina; γ-carboxiglutamato; ácido hipúrico; ácido octahidroindol-2-carboxílico; estatina; ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico; penicilamina (3-mercapto-D-valina); ornitina (Orn); citrulina; alfa-metil-alanina; para-benzoilfenilalanina; para-aminofenilalanina; p-fluorofenilalanina; fenilglicina; propargilglicina; N-metilglicinas (sarcosina, Sar); y terc-butilglicina; ácido diaminobutírico; ácido 7-hidroxi-tetrahidroisoquinolin carboxílico; naftilalanina; bifenilalanina; ciclohexilalanina; ácido amino-isobutírico (Aib); norvalina; norleucina (Nle); terc-leucina; ácido tetrahidroisoquinolin carboxílico; ácido piceólico; fenilglicina; homofenilalanina; ciclohexilglicina; dehidroleucina; 2,2-dietilglicina; ácido 1-amino-1-ciclopentanocarboxílico; ácido 1-amino-1-ciclohexanocarboxílico; ácido amino-benzoico; ácido amino-naftoico; ácido gamma-aminobutírico; difluorofenilalanina; ácido nipecótico; Ácido N-α-imidazol acético (IMA); tienil-alanina; t-butilglicina; desamino-Tyr; ácido aminovalérico (Ava); ácido piroglutamínico (<Glu); ácido α-aminoisobutírico (αAib); ácido γ-aminobutírico (γAbu); ácido α-aminobutírico (αAbu); ácido αγ-aminobutírico (αγAbu); 3-piridilalanina (Pal); Isopropil-α-N⁶lisina (Ilys); Naftilalanina (Nal); α-naftilalanina (α-Nal); β-naftilalanina (β-Nal); Acetil-β-naftilalanina (Ac-β-naftilalanina); α,β-naftilalanina; Nε-picolil-lisina (PicLys); 4-halo-fenilo; 4-pirolidilalanina; ácido isonipecótico carboxílico (inip); beta-aminoácidos; e isómeros, análogos y derivados de los mismos. Un experto en la materia sabría que esta definición incluye, los aminoácidos D y L; los alfa-, beta- y gamma-aminoácidos; los aminoácidos químicamente modificados; los aminoácidos de origen natural no proteogénicos; los aminoácidos raros; y los compuestos sintetizados químicamente que tienen propiedades conocidas en la técnica por ser característicos de un aminoácido. Adicionalmente, cada realización puede incluir cualquier combinación de los grupos.

Además, como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" incluye un compuesto o molécula que se aparta de la estructura de los aminoácidos de origen natural, pero que tienen sustancialmente la estructura de un aminoácido, de manera que pueden utilizarse para la sustitución de los aminoácidos de origen natural dentro de un péptido, después de lo cual la actividad del péptido, por ejemplo, la actividad de formación de agregados, aún se conserva. Por tanto, por ejemplo, en algunas realizaciones los aminoácidos pueden también incluir aminoácidos que tienen modificaciones o sustituciones de la cadena lateral y también incluyen ácidos orgánicos relacionados, amidas o similares. Sin limitación, un aminoácido puede ser un aminoácido proteogénico o no proteogénico. Como se usa en el presente documento, el término "proteogénico" indica que el aminoácido puede incorporarse en una proteína en una célula a través de las vías metabólicas conocidas.

En algunas realizaciones, un péptido anfifílico comprende al menos un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más) aminoácidos modificados químicamente. Como se usa en el presente documento, la expresión "aminoácido químicamente modificado" se refiere a un aminoácido que se ha tratado con uno o más reactivos. Un aminoácido modificado químicamente puede estar presente en cualquier posición en el péptido anfifílico. Cuando está presente más de un aminoácido modificado químicamente, pueden colocarse uno junto al otro o no. Cuando tres o más aminoácidos modificados químicamente están presentes algunos de los aminoácidos modificados químicamente pueden estar presentes uno junto al otro, mientras que algunos de los aminoácidos modificados químicamente no están al lado de otro aminoácido modificado químicamente.

En algunas realizaciones, el segmento de peptidilo hidrófilo comprende un aminoácido modificado químicamente. Sin limitaciones, el aminoácido modificado químicamente puede estar presente en cualquier posición del segmento de peptidilo hidrófilo, por ejemplo, leyendo desde el extremo N, en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y así sucesivamente del segmento de peptidilo hidrófilo.

En algunas realizaciones, el segmento de peptidilo hidrófobo comprende un aminoácido modificado químicamente. Sin limitaciones, el aminoácido modificado químicamente puede estar presente en cualquier posición del segmento de peptidilo hidrófobo, por ejemplo, leyendo desde el extremo N, en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y así sucesivamente del segmento de peptidilo hidrófobo.

En algunas realizaciones, los segmentos de peptidilo hidrófilos e hidrófobos pueden comprender cada uno al menos un aminoácido modificado químicamente. Cuando los segmentos de peptidilo hidrófilos e hidrófobos comprenden un aminoácido modificado químicamente, el número de dichos aminoácidos modificados químicamente presentes en cada segmento puede ser igual o diferente.

En algunas realizaciones, el péptido anfifílico comprende al menos un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) beta-aminoácido. Cuando más de un beta-aminoácido están presentes, pueden colocarse uno junto a otro o no uno junto a otro. Cuando tres o más beta-aminoácidos están presentes algunos de los beta-aminoácidos pueden estar presentes junto a otro beta-aminoácido mientras que algunos de los beta-aminoácidos no están junto a otro beta-aminoácido.

En algunas realizaciones, el segmento de peptidilo hidrófilo comprende un beta-aminoácido. Sin limitaciones, el beta-aminoácido puede estar presente en cualquier posición del segmento de peptidilo hidrófilo, por ejemplo, leyendo desde el extremo N, en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y así sucesivamente del segmento de peptidilo hidrófilo.

En algunas realizaciones, el segmento de peptidilo hidrófobo comprende un beta-aminoácido. Sin limitaciones, el beta-aminoácido puede estar presente en cualquier posición del segmento de peptidilo hidrófobo, por ejemplo, leyendo desde el extremo N, en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y así sucesivamente del segmento de peptidilo hidrófobo.

En algunas realizaciones, los segmentos de peptidilo tanto hidrófilos como hidrófobos pueden comprender cada uno al menos un beta-aminoácido. Cuando los segmentos de peptidilo hidrófilos e hidrófobos comprenden un beta-aminoácido, el número de dichos beta-aminoácidos de cada segmento puede ser el mismo o diferente.

Los beta-aminoácidos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, clorhidrato de L-β-homoprolina; ácido (±)-3-(Boc-amino)-4-(4-bifenilil)butírico; ácido (±)-3-(Fmoc-amino)-2-fenilpropiónico; ácido (1*S*,3*R*)-(+)-3-(Boc-amino)ciclopentanocarboxílico; ácido (2*R*,3*R*)-3-(Boc-amino)-2-hidroxi-4-fenilbutírico; ácido (2*S*,3*R*)-3-(Boc-amino)-2-hidroxi-4-fenilbutírico; ácido (R)-2-[(Boc-amino)metil]-3-fenilpropiónico; ácido (R)-3-(Boc-amino)-2-metilpropiónico; ácido (R)-3-(Boc-amino)-fenilpropiónico; ácido (R)-3-(Boc-amino)-4-(2-naftil)butírico; ácido (R)-3-(Boc-amino)-5-fenilpentanoico; ácido (R)-3-(Fmoc-amino)-4-(2-naftil)butírico; ácido (R)-(-)-pirrolidin-3-carboxílico; (R)-Boc-3,4-dimetoxi-β-Phe-OH; (R)-Boc-3-(3-piridil)-β-Ala-OH; (R)-Boc-3-(trifluorometil)-β-Phe-OH; (R)-Boc-3-ciano-β-Phe-OH; (R)-Boc-3-metoxi-β-Phe-OH; (R)-Boc-3-metil-β-Phe-OH; (R)-Boc-4-(4-piridil)-β-Homoala-OH; (R)-Boc-4-(trifluorometil)-β-HomoPhe-OH; (R)-Boc-4-(trifluorometil)-β-Phe-OH; (R)-Boc-4-bromo-β-Phe-OH; (R)-Boc-4-cloro-β-Homophe-OH; (R)-Boc-4-cloro-β-Phe-OH; (R)-Boc-4-ciano-β-Homophe-OH; (R)-Boc-4-ciano-β-Phe-OH; (R)-Boc-4-fluoro-β-Phe-OH; (R)-Boc-4-metoxi-β-Phe-OH; (R)-Boc-4-metil-β-Phe-OH; (R)-Boc-β-Tyr-OH; (R)-Fmoc-4-(3-piridil)-β-Homoala-OH; (R)-Fmoc-4-fluoro-β-Homophe-OH; ácido (S)-(+)-pirrolidin-3-carboxílico; ácido (S)-3-(Boc-amino)-2-metilpropiónico; ácido (S)-3-(Boc-amino)-4-(2-naftil)butírico; ácido (S)-3-(Boc-amino)-5-fenilpentanoico; ácido (S)-3-(Fmoc-amino)-2-metilpropiónico; ácido (S)-3-(Fmoc-amino)-4-(2-naftil)butírico; ácido (S)-3-(Fmoc-amino)-5-hexenoico; ácido (S)-3-(Fmoc-amino)-5-fenil-pentanoico; ácido (S)-3-(Fmoc-amino)-6-fenil-5-hexenoico; (S)-Boc-2-(trifluorometil)-β-Homophe-OH; (S)-Boc-2-(trifluorometil)-β-Homophe-OH; (S)-Boc-2-(trifluorometil)-β-Phe-OH; (S)-Boc-2-ciano-β-Homophe-OH; (S)-Boc-2-metil-β-Phe-OH; (S)-Boc-3,4-dimetoxi-β-Phe-OH; (S)-Boc-3-(trifluorometil)Phe-OH-β-Homo-; (S)-Boc-3-(trifluorometil)-β-Phe-OH; (S)-Boc-3-metoxi-β-Phe-OH; (S)-Boc-3-metil-β-Phe-OH; (S)-Boc-4-(4-piridil)-β-Homoala-OH; (S)-Boc-4-(trifluorometil)-β-Phe-OH; (S)-Boc-4-bromo-β-Phe-OH; (S)-Boc-4-cloro-β-Homophe-OH; (S)-Boc-4-cloro-β-Phe-OH; (S)-Boc-4-ciano-β-Homophe-OH; (S)-Boc-4-ciano-β-Phe-OH; (S)-Boc-4-fluoro-β-Phe-OH; (S)-Boc-4-yodo-β-Homophe-OH; (S)-Boc-4-metil-β-Homophe-OH; (S)-Boc-4-metil-β-Phe-OH; (S)-Boc-β-Tyr-OH; (S)-Boc-γ,γ-difenil-β-Homoala-OH; (S)-Fmoc-2-metil-β-Homophe-OH; (S)-Fmoc-3,4-difluoro-β-Homophe-OH; (S)-Fmoc-3-(trifluorometil)-β-Homophe-OH; (S)-Fmoc-3-ciano-β-Homophe-OH; (S)-Fmoc-3-metil-β-Homophe-OH; (S)-Fmoc-γ,γ-difenil-β-Homoala-OH; ácido 2-(Boc-aminometil)fenilacético; ácido 3-amino-3-(3-bromofenil)propiónico; ácido 3-amino-4,4,4-trifluorobutírico; ácido 3-aminobutanoico, ácido DL-3-aminoisobutírico; DL-β-aminoisobutírico puro; DL-β-homoleucina; DL-β-Homometionina; DL-β-homofenilalanina; DL-β-leucina; DL-β-fenilalanina; Clorhidrato de L-β-homoalanina; clorhidrato de ácido L-β-Homoglutámico; Clorhidrato de L-β-homoglutamina; Clorhidrato de L-β-Homohidroxiprolina; Clorhidrato de L-β-Homoisoleucina; Clorhidrato de L-β-homoleucina; Diclorhidrato de L-β-homolisina; Clorhidrato de L-β-Homometionina; clorhidrato de éster alílico de L-β-Homofenilalanina; Clorhidrato de L-β-homofenilalanina; L-β-homoserina; L-β-Homotreonina; clorhidrato de L-β-homotriptófano; Clorhidrato de L-β-homotirosina; clorhidrato de L-β-leucina; Boc-D-β-Leu-OH; Boc-D-β-Phe-OH;

Boc- β^3 -Homopro-OH; Boc- β -Glu(OBzl)-OH; Boc- β -HomoArg(Tos)-OH; Boc- β -Homoglu OBzl)-OH; Sal técnica de Boc- β -Homohyp(Bzl)-OH (diciclohexilamonio); Boc- β -Homolys(Z)-OH; Boc- β -Homoser(Bzl)-OH; Boc- β -Homothr(Bzl)-OH; Boc- β -Homotyr(Bzl)-OH; Boc- β -Ala-OH; Boc- β -Gln-OH; Boc- β -Homoala-OAll; Boc- β -Homoala-OH; Boc- β -Homogln-OH; Boc- β -Homoile-OH; Boc- β -Homoleu-OH; Boc- β -Homomet-OH; Boc- β -Homophe-OH; Boc- β -Homotrp-OH; Boc- β -Homotrp-OMe; Boc- β -Leu-OH; Boc- β -Lys (Z)-OH (diciclohexilamonio) sal; Boc- β -Phe-OH; 3-(bencilamino)propionato de etilo; Fmoc-D- β -Homophe-OH; Fmoc-L- β^3 -homoprolina; Fmoc- β -D-Phe-OH; Fmoc- β -Gln(Trt)-OH; Fmoc- β -Glu(OtBu)-OH; Fmoc- β -homoArg(Pmc)-OH; Fmoc- β -Homogln(Trt)-OH; Fmoc-p-Homoglu(OtBu)-OH; Fmoc- β -Homohyp(tBu)-OH; Fmoc- β -Homolys(Boc)-OH; Fmoc- β -Homoser(tBu)-OH; Fmoc- β -Homothr(tBu)-OH; Fmoc- β -Homotyr(tBu)-OH; Fmoc- β -Ala-OH; Fmoc- β -Gln-OH; Fmoc- β -Homoala-OH; Fmoc- β -Homogln-OH; Fmoc- β -Homoile-OH; Fmoc- β -Homoleu-OH; Fmoc- β -Homomet-OH; Fmoc- β -Homophe-OH; Fmoc- β -Homotrp-OH; Fmoc- β -Leu-OH; Fmoc- β -Phe-OH; N-acetil-DL- β -fenilalanina; Z-D- β -Dab(Boc)-OH; Z-D- β -Dab(Fmoc)-OH puro;; Z-DL- β -Homoalanina; Z- β -D-Homoala-OH; Z- β -Glu(OtBu)-OH, técnico; Z- β -Homotrp(Boc)-OH; Z- β -Ala-OH puro; Z- β -Ala-ONp puro;; Z- β -Dab(Boc)-OH; Z- β -Dab(Fmoc)-OH; Z- β -Homoala-OH; β -alanina; β -alanina BioXtra;; clorhidrato de éster etílico de β -alanina; clorhidrato de éster metílico de β -alanina; clorhidrato de ácido β -glutámico; clorhidrato del ácido *cis*-2-amino-3-ciclopenteno-1-carboxílico; ácido *cis*-3-(Boc-amino)ciclohexanocarboxílico; y ácido *cis*-3-(Fmoc-amino)ciclohexanocarboxílico.

En algunas realizaciones, un péptido anfifílico que se describe en el presente documento puede comprender al menos un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más) enlace amida modificado, por ejemplo, un enlace amida en la cadena principal reemplazado por un enlace seleccionado entre el grupo que consiste en el enlace peptídico psi reducido, urea, tiourea, carbamato, sulfonilurea, trifluoroetilamina, ácido orto-(aminoalquil)fenilacético, ácido para-(aminoalquil)-fenilacético, ácido meta-(aminoalquil)-fenilacético, tioamida, tetrazol, éster borónico y grupo olefínico. El enlace de reemplazo de amida puede estar presente en cualquier posición en el péptido anfifílico. Cuando dos o más enlaces de reemplazo de amida están presentes, pueden estar posicionados uno junto a otro (por ejemplo, a ambos lados de un aminoácido dado) o no (por ejemplo, solo un lado de un aminoácido dado está unido a través de un enlace de reemplazo de péptido con el siguiente aminoácido).

En algunas realizaciones, el enlace de reemplazo de amida está presente en el segmento de peptidilo hidrófilo. Sin limitaciones, el enlace de reemplazo de amida puede estar presente en cualquier posición del segmento de peptidilo hidrófilo, por ejemplo, leyendo desde el extremo N, en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y así sucesivamente del segmento de peptidilo hidrófilo.

En algunas realizaciones, el enlace de reemplazo de amida está presente en el segmento de peptidilo hidrófobo. Sin limitaciones, el enlace de reemplazo de amida puede estar presente en cualquier posición del segmento de peptidilo hidrófobo, por ejemplo, leyendo desde el extremo N, en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y así sucesivamente del segmento de peptidilo hidrófobo.

En algunas realizaciones, los segmentos de péptidos hidrófilos e hidrófobos pueden comprender cada uno al menos un enlace de sustitución de amida. Cuando los segmentos de peptidilo tanto hidrófilos como hidrófobos comprenden un enlace de reemplazo de amida, el número de dichos enlaces de reemplazo de amida en cada segmento puede ser igual o diferente.

El extremo C de un péptido anfifílico que se describe en el presente documento puede estar sin modificar o modificado por conjugación de un grupo protector de carboxilo o un grupo amida. Los grupos protectores de carboxilo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, ésteres tales como metilo, etilo, t-butilo, metoximetilo, 2,2,2-tricloroetilo y 2-haloetilo; ésteres de bencilo tales como trifenilmetilo, difenilmetilo, p-bromobencilo, o-nitrobencilo y similares; ésteres de sililo tales como trimetilsililo, trietilsililo, t-butildimetilsililo y similares; amidas; e hidrazidas. Otros grupos protectores de ácido carboxílico pueden incluir alfa-aminoácidos opcionalmente protegidos que están unidos con el resto amino de los alfa-aminoácidos. En algunas realizaciones, el extremo C de un péptido anfifílico se conjuga con NH₂, NH-alquilo o N(alquilo)₂.

Enlace entre segmentos hidrófilos e hidrófobos

Sin limitaciones, el segmento de peptidilo hidrófilo puede estar unido a o bien el extremo N o el extremo C del segmento de peptidilo hidrófobo. En consecuencia, un péptido anfifílico puede ser (segmento de peptidilo hidrófilo)-enlazador-(segmento de peptidilo hidrófobo) o (segmento de peptidilo hidrófobo)-enlazador-(segmento de peptidilo hidrófilo). En una realización, el segmento de peptidilo hidrófilo está unido al extremo N del segmento de peptidilo hidrófobo. Dicho de otra manera, en una realización, el segmento de peptidilo hidrófobo está unido al extremo C del segmento de peptidilo hidrófilo. El enlace entre los segmentos de péptidos hidrófilos e hidrófobos puede ser un enlace amida, un enlace de reemplazo de amida o un enlazador como se define en el presente documento.

En algunas realizaciones, el enlace entre los segmentos de peptidilo hidrófilos e hidrófobos es un enlace amida (por ejemplo, -NHC(O)-) o un enlace de reemplazo de amida.

En algunas realizaciones, el enlace entre los segmentos de peptidilo hidrófilos e hidrófobos incluye un aminoácido, dos aminoácidos o un péptido que comprende de 3 a 15 aminoácidos. Ha de entenderse que cuando los segmentos

de peptidilo hidrófilos e hidrófobos están unidos por una cadena de aminoácidos, el enlazador puede comprender una o más de las modificaciones de péptidos que se describen en el presente documento, por ejemplo, enlace de reemplazo de amida, beta-aminoácidos, D-aminoácidos, aminoácidos químicamente modificados, etc.

5 Péptidos anfifílicos de ejemplo y usos de los mismos

En algunas realizaciones, un péptido anfifílico comprende una secuencia de aminoácidos (L-AA²¹)_r-((L-AA¹¹)-(D-AA¹²))_b-(L-AA¹³), en la que AA²¹ es un resto de Lys o una sustitución del mismo; AA¹¹ y AA¹³ es cada uno independientemente un resto de Trp o una sustitución del mismo, AA¹² es un resto de Leu o una sustitución del mismo, y en la que r' es un número entero 3 a 21 y b' es un número entero de 3 a 20 y en la que al menos uno de un grupo amino del extremo N o un grupo amino de cadena lateral de al menos un resto AA²¹ se conjuga con un grupo protector de nitrógeno o de amino.

El término "sustitución" cuando se refiere a un péptido, se refiere a un cambio en un aminoácido por una entidad diferente, por ejemplo, otro aminoácido o resto de aminoácido. Las sustituciones pueden ser sustituciones conservativas o no conservativas. En algunas realizaciones, la sustitución es una sustitución conservativa. Como se usa en el presente documento, el término "sustitución conservativa" se refiere a una sustitución de aminoácidos en la que el resto de aminoácido sustituto es de carga similar y/o de hidrofobia similares que el resto reemplazado. El resto sustituto puede ser de un tamaño similar o de menor tamaño o de mayor tamaño que el resto reemplazado, a condición de que el resto sustituto tenga propiedades bioquímicas similares a las del resto reemplazado. Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, sustituciones hechas entre aminoácidos dentro de los siguientes grupos: (i) los aminoácidos no polares pequeños: alanina (Ala), metionina (Met), isoleucina (Ile), leucina (Leu) y valina (Val); (ii) los aminoácidos polares pequeños: glicina (Gly), serina (Ser), treonina (Thr) y cisteína (Cys); (iii) los amido aminoácidos: glutamina (Gln) y asparragina (Asn); (iv) los aminoácidos aromáticos: fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) y triptófano (Trp); (v) los aminoácidos básicos: lisina (Lys), arginina (Arg) e histidina (His); y (vi) los aminoácidos ácidos: ácido glutámico (Glu) y ácido aspártico (Asp). Las sustituciones que son de carga neutra y que reemplazan un resto con un resto más pequeño también pueden considerarse como "sustituciones conservativas" incluso si los restos están en diferentes grupos (por ejemplo, el reemplazo de fenilalanina por la isoleucina más pequeña). La expresión "sustitución conservativa" también abarca el uso de miméticos de aminoácidos, análogos, variantes o aminoácidos no proteinogénicos o no convencionales. A modo de ejemplo solamente, la valina (Val) puede sustituirse por AdaA o ADAG; la prolina puede sustituirse por ácido L-l-tioazolidin-4-carboxílico o ácido D-o-L-1-oxazolidin-4-carboxílico (véase Kauer, Patente de los EE.UU. N.º (4.511.390)); y la glicina (Gly) puede sustituirse por Aib, β-Ala o Acp.

En consecuencia, en algunas realizaciones, AA²¹ puede ser un resto de Lys o una sustitución conservativa del mismo, por ejemplo, Arg o His. En una realización, AA²¹ es un resto Lys o un derivado del mismo.

En algunas realizaciones, AA¹¹ y AA¹³ pueden ser cada uno independientemente un resto de Trp o una sustitución conservativa del mismo, por ejemplo, Phe o Tyr. En una realización, AA¹¹ y AA¹³ es cada uno independientemente un resto de Trp o un derivado del mismo.

En algunas realizaciones, AA¹² puede ser un resto de Leu o una sustitución conservativa del mismo, por ejemplo, Ala, Met, Ile o Val. En una realización, AA¹² es un resto de Leu o un derivado del mismo.

En algunas realizaciones, un péptido anfifílico comprende una secuencia de aminoácidos (L-Lys)_r-((L-Trp)-(D-Leu))_m-(L-Trp), en la que r' es un número entero de 3-21 y m' es un número entero de 3-20 y en la que al menos uno de un grupo amino del extremo N o un grupo amino de cadena lateral de al menos un resto de Lys se conjuga con un grupo protector de nitrógeno o de amino.

En algunas realizaciones, r' y m' son independientemente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15. En algunas realizaciones, los dos grupos r' y m' son iguales. En una realización, tanto r' como m' son 3.

En algunas realizaciones, el péptido anfifílico comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: Ac-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp)-NH₂ (también denominada CD3ac el presente documento, en la que la abreviatura "ac" o "Ac" se refiere a la acetilación de cualquier grupo amino del extremo N de un péptido anfifílico o un grupo amino de un resto Lys en el segmento de peptidilo hidrófilo);

Ac-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp)-NH₂;
 (L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp)-NH₂;
 (L-Lys)-(L-Lys(Ac))-(L-Lys)-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp)-NH₂;
 (L-Lys(Ac))-(L-Lys)-(L-Lys)-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp)-NH₂;
 (L-Lys)-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp)-NH₂;
 (L-Lys(Ac))-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp)-NH₂;
 (L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Lys)-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp)-NH₂;
 (L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp)-NH₂;
 Ac-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp)-NH₂;

Ac-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp);
 (L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp);
 (L-Lys)-(L-Lys(Ac))-(L-Lys)-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp);
 (L-Lys(Ac))-(L-Lys)-(L-Lys)-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp);
 5 (L-Lys)-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp);
 (L-Lys(Ac))-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp);
 (L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Lys)-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp);
 (L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp);
 Ac-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp)-NH₂;
 10 Ac-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-(L-Lys)-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp)-NH₂;
 Ac-(L-Lys(Ac))-(L-Lys)-(L-Lys)-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp)-NH₂;
 Ac-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp)-NH₂;
 Ac-(L-Lys(Ac))-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp)-NH₂;
 Ac-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Lys)-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp)-NH₂;
 15 Ac-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp);
 Ac-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-(L-Lys)-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp);
 Ac-(L-Lys(Ac))-(L-Lys)-(L-Lys)-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp);
 Ac-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp);
 20 Ac-(L-Lys(Ac))-(L-Lys)-(L-Lys(Ac))-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp);
 Ac-(L-Lys(Ac))-(L-Lys(Ac))-(L-Lys)-((L-Trp)-(D-Leu))₃-(L-Trp); y cualquier combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, el segmento de peptidilo hidrófilo del péptido anfifílico puede comprender una cisteína. En algunas realizaciones, la cisteína puede estar presente en el extremo N del segmento de peptidilo hidrófilo.

El inventor ha descubierto que algunas realizaciones de los péptidos anfifílicos que se describen en el presente documento pueden tener capacidad de penetración celular. Por tanto, en algunas realizaciones, los péptidos anfifílicos que se describen en el presente documento pueden utilizarse como agentes de penetración celular y/o de transfección. En estas realizaciones, los péptidos anfifílicos pueden diseñarse para cargarse positivamente. En consecuencia, se proporciona en el presente documento el uso de una composición que comprende un péptido anfifílico cargado positivamente como agente de penetración en las células o agente de transfección, en el que el péptido anfifílico cargado positiva comprende un segmento de peptidilo hidrófobo y un segmento de peptidilo hidrófilo. El segmento de peptidilo hidrófobo del péptido anfifílico cargado positiva comprende una secuencia de aminoácidos de (Trp-Leu)_m-(Trp)_n o (Leu-Trp)_p-(Leu)_q, en la que cada Trp es D-Trp o L-Trp y cada Leu es D-Leu o L-Leu, m y p son independientemente un número entero de 1 a 5 y n y q son, independientemente 0 o 1, a condición de que cuando Trp es D-Trp entonces Leu es L-Leu y cuando Trp es L-Trp entonces Leu es D-Leu o viceversa; mientras que el segmento de peptidilo hidrófilo comprende una secuencia de aminoácidos de (Lys)_r, en la que r es un número entero de 1 a 15. Además, en el péptido anfifílico cargado positivamente, al menos uno de los restos de Lys o el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico no están acetilados. En algunas realizaciones, todos los restos de Lys y el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico cargado positivamente están sin acetilar.

En algunas realizaciones, el péptido anfifílico cargado positivamente puede comprender una secuencia de aminoácidos de (L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-X, en la que X está ausente o es NH₂.

En algunas realizaciones, la composición puede comprender además una molécula de ácido nucleico u oligonucleótido (por ejemplo, ADN o ARN) que se entrega en una célula. En algunas realizaciones, la composición puede comprender además una pluralidad (por ejemplo, al menos 2 o más) de moléculas de ácidos nucleicos o de oligonucleótidos (por ejemplo, ADN o ARN, incluyendo, pero no limitados a, ARNip, ARNhc, miARN). En algunas realizaciones, las moléculas de ácidos nucleicos o los oligonucleótidos pueden diseñarse para su uso en la intervención terapéutica, por ejemplo, la terapia génica o la terapia con ARNip.

Síntesis de péptidos

Los péptidos anfifílicos que se describen en el presente documento pueden sintetizarse de acuerdo con los métodos habituales de solución y química de péptidos en fase sólida, o mediante métodos clásicos conocidos en la técnica. La purificación de los péptidos es bien conocida en la técnica y puede ser, por ejemplo, por HPLC. Pueden encontrarse métodos que describen métodos útiles de síntesis y purificación de péptidos, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 20060084607.

Los péptidos que se describen en el presente documento pueden construirse por síntesis mediante técnicas conocidas adecuadas de polimerización de péptidos, tales como técnicas exclusivamente en fase sólida, técnicas parcialmente en fase sólida, condensación de fragmentos o acoplamiento clásico en solución. Por ejemplo, los péptidos pueden sintetizarse mediante el método en fase sólida utilizando métodos convencionales basados en cualquiera de los grupos protectores t-butiloxicarbonilo (BOC) o 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Esta metodología se describe por G. B. Fields et al. en *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W. M. Freeman & Company,

Nueva York, Nueva York, págs. 77-183 (1992) y en el libro de texto "*Solid-Phase Synthesis*", Stewart & Young, Freeman & Company, San Francisco, 1969, y se ejemplifican mediante la divulgación de la patente de los EE.UU. N.º 4.105.603, presentada el 8 de agosto de 1979. La síntesis clásica en solución se describe en detalle en "*Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl): Synthese von Peptiden*", E. Wunsch (editor) (1974) Georg Thieme Verlag, Stuttgart Alemania Occidental. El método de síntesis por condensación de fragmentos se ejemplifica en la patente de los EE.UU. N.º 3.972.859. Otras síntesis disponibles se ejemplifican en la Patente de los EE.UU. N.º 3.842.067, Patente de los EE.UU. N.º 3.872.925, presentada el 28 de enero 1975, Merrifield B, *Protein Science* (1996), 5: 1947-1951; *The chemical synthesis of proteins*; Mutter M, *Int J Pept Protein Res* Marzo de 1979; 13 (3): 274-7 *Studies on the coupling rates in liquid-phase peptide synthesis using competition experiments*; and *Solid Phase Peptide Synthesis in the series Methods in Enzymology* (Fields, G. B. (1997) *Solid-Phase Peptide Synthesis*. Academic Press, San Diego. n.º 9830).

Los métodos para preparar peptidomiméticos incluyen la modificación del grupo amino N-terminal, del grupo carboxilo C-terminal y/o el cambio de uno o más de los enlaces amino en el péptido a un enlace no amino. Dos o más de dichas modificaciones pueden acoplarse en un inhibidor peptidomimético. Se describen modificaciones de péptidos para producir peptidomiméticos, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. N.º 5.643.873 y N.º 5.654.276.

Peptidomiméticos

En algunas realizaciones, el péptido anfílico es un peptidomimético. Por ejemplo, el segmento peptídico hidrófilo puede ser un peptidomimético, el segmento de peptidilo hidrófobo puede ser un peptidomimético o ambos pueden ser peptidomiméticos.

Los métodos de diseño de peptidomiméticos y de selección de peptidomiméticos funcionales son bien conocidos para los expertos en la materia. Un método básico de diseño de una molécula que imita una proteína o péptido conocido es identificar primero la región o regiones activas de la proteína conocida (por ejemplo, en el caso de una interacción anticuerpo-antígeno, uno identifica qué región o regiones del anticuerpo que permiten la unión al antígeno) y, después, buscar un mimético que emule la región activa. Si la región activa de una proteína conocida es relativamente pequeña, se prevé que un mimético será más pequeño (por ejemplo en peso molecular) que la proteína, y, correspondientemente, más fácil y más barato de sintetizar. Un mimético de este tipo podría utilizarse como sustituto un conveniente para la proteína, como un agente para la interacción con la molécula diana.

Los métodos para preparar peptidomiméticos incluyen la modificación del grupo amino N-terminal, del grupo carboxilo C-terminal, y/o el cambio de uno o más de los enlaces amida en el péptido a un enlace no amida o amida modificada. Pueden acoplarse dos o más de dichas modificaciones en un peptidomimético. Se describen modificaciones de péptidos para producir peptidomiméticos, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. N.º 5.643.873 y N.º 5.654.276.

Por ejemplo, Reineke et al. (1999, *Nature Biotechnology*, 17; 271-275) diseñaron una molécula que imita un sitio de unión de la proteína interleucina-10 usando una gran biblioteca de péptidos sintéticos cortos, cada uno de los cuales correspondía a una sección corta de la interleucina 10. La unión de cada uno de estos péptidos a la diana (en este caso un anticuerpo contra la interleucina 10) se ensayó después individualmente mediante una técnica de ensayo, para identificar péptidos potencialmente relevantes. Pueden utilizarse bibliotecas de presentación de fagos de péptidos y método de barrido de alanina.

Otros métodos para diseñar peptidomiméticos para un péptido o proteína en particular incluyen los que se describen en la patente europea EP1206494, el programa SuperMimic de Andrean Goede et. al. 2006 *BMC Bioinformatics*, 7:11; y el programa MIMETIC de W. Campbell et. al., 2002, *Microbiology and Immunology* 46:211-215. El programa SuperMimic está diseñado para identificar compuestos que imitan partes de una proteína o posiciones en las proteínas que son adecuadas para la inserción de miméticos. La aplicación proporciona bibliotecas que contienen componentes básicos de peptidomiméticos por un lado y estructuras de proteínas por otro lado. La búsqueda de enlazadores peptidomiméticos prometedores para un péptido dado se basa en la superposición del péptido con varios conformeros del mimético. Los nuevos elementos o proteínas sintéticos pueden importarse y usarse en la búsqueda. El programa de ordenador MIMETIC, que genera una serie de péptidos para la interacción con una secuencia de péptidos diana se revisó por W. Campbell et. al., 2002. Un análisis profundo del tema se revisa en "*Peptide Mimetic Design with the Aid of Computational Chemistry*" de James R. Damewood Jr. en *Reviews in Computational Chemistry*, enero de 2007, volumen 9 de la serie del libro: *Reviews in Computational Chemistry*, Editores Kenny B. Lipkowitz, Donald B. BoydPrint ISBN: 9780471186397 ISBN: 9780470125861 Publicado por John Wiley & Sons, Inc.; y en T. Tselios, et. al, *Amino Acids*, 14: 333-341, 1998.

Los métodos para preparar bibliotecas que contienen diversas poblaciones de péptidos, peptoides y peptidomiméticos son bien conocidos en la técnica y diversas bibliotecas están disponibles en el mercado (véase, por ejemplo, Ecker y Crooke, *Biotechnology* 13: 351-360 (1995) y Blondelle et al, *Trends Anal Chem.* 14:83-92 (1995); véase, también, Goodman y Ro, *Peptidomimetics for Drug Design*, in "*Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*" Vol 1 (ed. M. E. Wolff; John Wiley & Sons 1995), páginas 803-861 y Gordon et al, *J. Med Chem* 37: 1385-1401 (1994). Un experto en la materia entiende que un péptido puede producirse in vitro directamente o puede

expresarse a partir de un ácido nucleico, que puede producirse in vitro. Los métodos de péptidos sintéticos y química de ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica.

También puede producirse una biblioteca de moléculas de péptidos, por ejemplo, mediante la construcción de una biblioteca de expresión de ADNc a partir de ARNm recogido de un tejido de interés. Los métodos para producir dichas bibliotecas son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et. al, *Molecular Cloning: A laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989). Preferentemente, un péptido codificado por el ADNc se expresa en la superficie de una célula o un virus que contiene el ADNc.

10 Ligandos y principios activos

Una amplia diversidad de entidades, por ejemplo, ligandos, pueden acoplarse a un péptido anfifílico que se describe en el presente documento o a una partícula de péptidos que se describe más adelante. Los ligandos pueden incluir moléculas de origen natural o moléculas recombinantes o sintéticas. En algunas realizaciones, un ligando puede alterar la distribución, la dirección o la vida útil de un péptido anfifílico que se describe en el presente documento o una partícula de péptidos hecha a partir del mismo. En algunas realizaciones, un ligando puede proporcionar una afinidad mejorada (por ejemplo, un aumento de la fuerza de unión) para una diana seleccionada, por ejemplo, molécula, célula o tipo de célula, compartimento, por ejemplo, un compartimento celular o de un órgano, tejido, órgano o región del cuerpo, como, por ejemplo, en comparación con una especie que carece de un ligando de este tipo. En algunas realizaciones, un ligando puede proporcionar una especificidad potenciada de un péptido anfifílico que se describe en el presente documento o de una partícula de péptidos hecha a partir del mismo para una diana seleccionada, por ejemplo, en comparación con un péptido anfifílico sin un ligando de este tipo. El término "especificidad" como se usa en el presente documento se refiere a la capacidad de un péptido anfifílico o de una partícula de péptidos para unirse preferentemente a una diana seleccionada por sobre cualesquiera otras entidades. Por ejemplo, la presencia de un ligando en un péptido anfifílico y/o una partícula de péptidos que se describen en el presente documento puede permitir que el péptido anfifílico o la partícula de péptidos se unan preferentemente a una diana seleccionada por encima de cualquier otra entidad, en comparación con un péptido anfifílico o partícula de péptidos sin un ligando de este tipo.

Sin limitación, un ligando puede seleccionarse entre el grupo que consiste en polímeros, péptidos, polipéptidos, proteínas, peptidomiméticos, glicoproteínas, lectinas, nucleósidos, nucleótidos, ácidos nucleicos, monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, lipopolisacáridos, vitaminas, lípidos, esteroides, hormonas, cofactores, receptores, ligandos de receptores y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones de este y otros aspectos que se describen en el presente documento, el ligando se selecciona entre el grupo que consiste en polietilenglicol (PEG, por ejemplo, PEG-2K, PEG-5K, PEG-10K, PEG-12K, PEG-15K, PEG-20K, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, poli(óxido de etileno) (PEO), poli(propilenglicol) (PPG), poli(óxido de etileno-co-óxido de propileno), ácido hialurónico, poli(2-metacrilato de hidroxietilo), heparina, polivinil(pirrolidona), sulfato de condroitano, quitosano, glucosaminoglucanos, dextrano, dextrina, sulfato de dextrano, acetato de celulosa, carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, celulósicos, poli(trimetilenglicol), poli(tetrametilenglicol), polipéptidos, poli(acrilamida), poli(acrilamida), poli(etilamina), poli(alilamina), copolímero de estireno-anhídrido de anhídrido de ácido maleico, poli(L-lactida-co-glicólido), copolímero de éter de divinilo-anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), alcohol polivinílico (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrilico), polímeros de N-isopropilacrilamida, polifosfacina, polietilenimina, espermina, espermidina, poliaminas, pseudopéptido-poliamina, peptidomimético poliamina, poliamina dendrímero, arginina, amidina, protamina, tiotropina, melanotropina, lectina, proteína surfactante A, mucina, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, aptámero, asialofetina, hialuronano, procolágeno, insulina, transferrina, albúmina, acridinas, crospsoraleno, mitomicina C, TPPC4, texafirina, safirina, hidrocarburos aromáticos policíclicos (por ejemplo, fenazina, dihidrofenazina), ácidos biliares, colesterol, ácido cólico, ácido adamantano acético, ácido 1-pireno butírico, dihidrotestosterona, 1,3-bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido 03-(oleoil)litocílico, ácido 03-(oleoil)colénico, dimetoxitritilo o fenoxazina), péptido RGD, marcadores radiomarcados, haptenos, naproxeno, aspirina, dinitrofenilo, HRP, AP, lectinas, vitamina A, vitamina E, vitamina K, vitamina B, ácido fólico, vitamina B12, riboflavina, biotina, piridoxal, taxol, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, japlakinólido, latrunculina A, faloidina, Swinholida A, indanocina, mioservina, factor de necrosis tumoral alfa (TNF), interleucina-1 beta, interferón gamma, GalNAc, galactosa, manosa, manosa-6P, grupos de azúcares tales como el grupo de GalNAc, grupo de manosa, grupo de galactosa, un aptámero, ligandos de los receptores de integrina, ligandos de receptores de quimiocinas, ligandos de receptores de serotonina, PSMA, endotelina, GCP11, somatostatina, péptido bacteriano de penetración de la pared celular, péptido GALA, péptido EALA, péptido INF-7, péptido Inf HA-2, péptido diINF-7, péptido diINF-3, péptido GLF, péptido-INF3 GALA, péptido INF-5, péptido penetratina, fragmento de Tat 48-60, péptido PVEC, péptido de transportano, péptido LL-37, péptido cecropina P1, péptido α -defensina, péptido beta-defensina, péptido PR-39, péptido indolicidina, péptido rFGF, análogo de rFGF, batenecina, cecropinas, licotoxinas, paradaxinas, buforina, CPF, péptido similar a la bombinina (BLP), catelicidinas, ceratotoxinas, péptidos de *S. clava*, péptidos intestinales antimicrobianos de mixina (HFIAP), magaininas, brevininas-2, dermaseptinas, melitinas, pleurocidina, péptidos H₂A, péptidos de Xenopus, esculentinas-1, caerinas y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, un ligando puede incluir un principio activo. Como se usa en el presente documento, un "principio activo" se refiere a una molécula que se va a entregar a una célula. En consecuencia, sin limitación, un principio activo puede seleccionarse entre el grupo que consiste en pequeñas moléculas orgánicas o inorgánicas, monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, macromoléculas biológicas, por ejemplo, péptidos, proteínas, análogos de péptidos y derivados de los mismos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos, análogos de ácidos nucleicos y derivados, polinucleótidos, oligonucleótidos, enzimas, un extracto hecho de materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos o células de animales o tejidos, composiciones de origen natural o sintético, partículas o cualquier combinación de los mismos. Un principio activo puede tener carga neutra o comprender una carga neta, por ejemplo, el principio activo es aniónico o catiónico. Además, un principio activo puede ser hidrófobo, hidrófilo o anfifílico. En algunas realizaciones, el principio activo comprende al menos un grupo anillo o heteroanillo.

Como se usa en el presente documento, el término "partículas" se refiere a una partícula, polvo, copo, etc., que existe inherentemente en una forma relativamente pequeña y puede formarse por, por ejemplo, molienda, trituración, fragmentación, pulverización, atomización o subdividiendo de otro modo una forma más grande del material en una forma relativamente pequeña.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula pequeña" puede referirse a compuestos que son "similares al producto natural", sin embargo, la expresión "molécula pequeña", no se limita a compuestos "similares al producto natural". Más bien, una molécula pequeña normalmente se caracteriza por que contiene varios enlaces carbono-carbono y tiene un peso molecular de menos de 5000 Dalton (5 kD), preferentemente de menos de 3 kD, más preferentemente de menos de 2 kD y mucho más preferentemente de menos de 1 kD. En algunos casos, es mucho más preferido que una molécula pequeña tenga una masa molecular igual o de menos de 700 Dalton.

En algunas realizaciones, el principio activo puede ser un péptido o una proteína. Como se usa en el presente documento, el término "péptido" se utiliza en su sentido más amplio para referirse a compuestos que contienen dos o más aminoácidos, equivalentes de ácido amino u otros grupos no aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados. Los equivalentes de péptidos pueden diferir de péptidos convencionales por el reemplazo de uno o más aminoácidos por ácidos orgánicos relacionados (tales como PABA), aminoácidos o similares o la sustitución o modificación de cadenas laterales o grupos funcionales. Un péptido puede ser de cualquier tamaño de largo; sin embargo, en algunas realizaciones, se prefieren péptidos que tienen veinte o un menor número total de aminoácidos. Además, el péptido puede ser lineal o cíclico. Las secuencias de péptidos específicamente citadas en el presente documento se escriben con el extremo amino terminal a la izquierda y el extremo carboxi terminal a la derecha. Además, el término "péptido" incluye en general proteínas, que son generalmente polipéptidos. Como se usa en el presente documento, el término "proteína" se utiliza para describir proteínas, así como fragmentos de las mismas. Por tanto, cualquier cadena de aminoácidos que presente una estructura tridimensional está incluida en el término "proteína" y los fragmentos de proteína, en consecuencia, se incluyen.

Un peptidomimético es una molécula capaz de plegarse en una estructura tridimensional definida similar a un péptido natural.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico" se refiere a polímeros (polinucleótidos) u oligómeros (oligonucleótidos) de nucleótido o monómeros de nucleósidos que consisten en bases de origen natural, azúcares y enlaces interazúcar. La expresión "ácido nucleico" incluye también polímeros u oligómeros que comprenden monómeros de origen no natural o porciones de los mismos, que funcionan de manera similar. Dichos ácidos nucleicos modificados o sustituidos a menudo se prefieren sobre las formas nativas debido a propiedades tales como, por ejemplo, la captación celular mejorada y una mayor estabilidad en presencia de nucleasas.

Un ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario. Un ácido nucleico monocatenario puede tener regiones de doble cadena y un ácido nucleico bicatenario puede tener regiones de cadena simple. Los ácidos nucleicos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a genes estructurales, genes que incluyen regiones de control y de terminación, sistemas auto-replicantes como el ADN viral o plasmídico, ARN monocatenarios y bicatenarios y otros reactivos de ARN de interferencia (agentes ARNi o agentes iARN), ARN de corta horquilla (ARNhc), oligonucleótidos antisentido, ribozimas, microARN, miméticos de microARN, aptámeros, antimiros, antagomiros, oligonucleótidos formadores de triplex, activadores de ARN, oligonucleótidos inmunoestimulantes y oligonucleótidos señuelo.

En algunas realizaciones, el principio activo es biológicamente activo o tiene actividad biológica. Como se usa en el presente documento, la expresión "actividad biológica" o "bioactividad" se refiere a la capacidad de un compuesto para influir en una muestra biológica. La actividad biológica puede incluir, sin limitación, el desencadenamiento de una respuesta estimuladora, inhibidora, reguladora, tóxica o letal en un ensayo biológico en los niveles molecular, celular, tisular o de órganos. Por ejemplo, una actividad biológica puede referirse a la capacidad de un compuesto de presentar o modular el efecto/actividad de una enzima, bloquear un receptor, estimular un receptor, modular el nivel de expresión de uno o más genes, modular la proliferación celular, modular la división celular, modular la morfología celular o cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, una actividad biológica puede referirse a la capacidad de un compuesto para producir un efecto tóxico en una muestra biológica o puede referirse a una

capacidad de modificar químicamente una molécula o célula diana.

En algunas realizaciones, el principio activo es un agente terapéutico. Como se usa en el presente documento, la expresión "agente terapéutico" se refiere a un agente biológico o químico utilizado para el tratamiento, la curación, la mitigación o la prevención de afecciones perjudiciales en un sujeto. La expresión "agente terapéutico" también incluye sustancias y agentes para combatir una enfermedad, afección o trastorno de un sujeto, e incluye fármacos, diagnósticos e instrumentación. "Agente terapéutico" también incluye cualquier cosa usada en el diagnóstico médico o para restablecer, corregir o modificar las funciones fisiológicas. Las expresiones "agente terapéutico" y "agente farmacéuticamente activo" se usan indistintamente en el presente documento.

Un agente terapéutico puede seleccionarse de acuerdo con el objetivo del tratamiento y la acción biológica deseada. Por tanto, un agente terapéutico puede seleccionarse entre cualquier clase adecuada para el objetivo terapéutico. Además, el agente terapéutico puede seleccionarse o disponerse para proporcionar actividad terapéutica durante un período de tiempo.

El compuesto de ejemplo farmacéuticamente activo incluye, pero no se limita a, los que se encuentran en *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 13ª Edición, Eds de Harrison. T. R. Harrison McGraw-Hill NY, NY; *Physicians Desk Reference*, 50ª edición, 1997, Oradell Nueva Jersey, Medical Economics Co.; *Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8ª Edición, Goodman y Gilman, 1990; Farmacopea de los Estados Unidos, el Formulario Nacional, USP XII NF XVII, 1990; edición actual de *The Pharmacological Basis of Therapeutics* de Goodman y Gilman; y la edición actual de *The Merck Index*.

Los agentes de ejemplo farmacéuticamente activos incluyen, pero no se limitan a, esteroides y agentes antiinflamatorios no esteroideos, fármacos antireestenóticos, agentes antimicrobianos, factores angiogénicos, bloqueantes del canal de calcio, agentes trombolíticos, agentes antihipertensivos, anticoagulantes, agentes antiarrítmicos, glucósidos cardíacos y similares.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en ácido salicílico y derivados (aspirina), para-aminofenol y derivados (acetaminofeno), ácidos arilpropiónicos (ibuprofeno), corticoesteroides, antagonistas del receptor de la histamina y antagonistas del receptor de la bradicinina, antagonistas de los receptores de leucotrienos, antagonistas de receptor de prostaglandina, antagonistas del receptor de factor de activación de plaquetas, sulfonamidas, trimetoprim-sulfametoxazol, quinolonas, penicilinas, cefalosporina, factor básico de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor ácido de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento transformante angiogénico alfa y beta, factor de necrosis tumoral, angiopoietina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, dihidropiridinas (por ejemplo, nifedipino, benzotiazepinas tales como diltiazem y fenilalquilaminas tales como verapamilo), activador del plasminógeno urocinasa, urocinasa, estreptocinasa, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), espironolactona, activador del plasminógeno tisular (tPA), diuréticos, tiazidas, agentes antiadrenérgicos, clonidina, propranolol, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, captopril, antagonistas de los receptores de angiotensina, losartán, antagonistas de los canales de calcio, nifedipino, heparina, warfarina, hirudina, péptido anticoagulante de garrapata y heparinas de bajo peso molecular tales como enoxaparina, lidocaína, procainamida, encainida, flecainida, bloqueantes beta adrenérgicos, propranolol, amiodarona, verapamilo, diltiazem, cloruro de níquel, glucósidos cardíacos, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, antagonistas de los receptores de angiotensina, nitrovasodilatadores, agentes hipolipemiantes (por ejemplo, ácido nicotínico, probucol, etc.), resinas de unión a ácidos biliares (por ejemplo, derivados de colestiramina y de ácido fibríco, por ejemplo, clofibrato), inhibidores de la HMG CoA reductasa, inhibidores de la HMG CoA sintasa, inhibidores de la escualeno sintasa, inhibidores de la escualeno epoxidasa, estatinas (por ejemplo, lovastatina, cerivastatina, fluvastatina, pravastatina, simvastatina, etc.), antipsicóticos, ISRS, anticonvulsivantes, anticonceptivos, analgésicos sistémicos y locales (dolor crónico, factores de crecimiento/remodelación óseo (reclutamiento de los osteoblastos/osteoclastos y factores estimulantes), neurotransmisores (L-DOPA, dopamina, neuropéptidos), fármacos para el enfisema, TGF-beta), rapamicina, naloxona, paclitaxel, anfotericina, dexametasona, flutamida, vancomicina, fenobarbital, cimetidina, atenolol, aminoglucósidos, hormonas (por ejemplo, hormona liberadora de tirotropina, p-nitrofenil beta-cellopentaosido y hormona liberadora de hormona luteinizante), vincristina, amilorida, digoxina, morfina, procainamida, quinidina, quinina, ranitidina, triamtereno, trimetoprim, sales de vancomicina, aminoglucósidos y penicilina y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En algunas realizaciones, el principio activo es un ARNip, un ARN de horquilla corta (ARNhc), un oligonucleótido antisentido, una ribozima, un microARN, un mimético de microARN, un aptámero, un antimiro, un antagonismo, un oligonucleótido formador de triplex, una ARN activador, un oligonucleótido inmunoestimulante, un oligonucleótido señuelo, un plásmido o un vector de ADN.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un material radiactivo. Los materiales radiactivos adecuados incluyen, por ejemplo, de ⁹⁰itrio, ¹⁹²iridio, ¹⁹⁸oro, ¹²⁵yodo, ¹³⁷cesio, ⁶⁰cobalto, ⁵⁵cobalto, ⁵⁶cobalto, ⁵⁷cobalto, ⁵⁷magnesio, ⁵⁵hierro, ³²fósforo, ⁹⁰estroncio, ⁸¹rubidio, ²⁰⁶bismuto, ⁶⁷galio, ⁷⁷bromo, ¹²⁹cesio, ⁷³selenio, ⁷²selenio, ⁷²arsénico, ¹⁰³paladio, ¹²³plomo, ¹¹¹Indio, ⁵²hierro, ¹⁶⁷talio, ⁵⁷níquel, ⁶²cinc, ⁶²cobre, ²⁰¹talio y ¹²³yodo. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, pueden usarse partículas que comprenden un material radiactivo para tratar el tejido

enfermo tal como tumores, malformaciones arteriovenosas y similares.

En algunas realizaciones, el principio activo es un agente formador de imágenes. Como se usa en el presente documento, la expresión "agente formador de imágenes" se refiere a un elemento o grupo funcional en una molécula que permite la detección, la formación de imágenes y/o el seguimiento de la presencia y/o la progresión de una afección o afecciones, trastorno o trastornos patológicos y/o enfermedad o enfermedades. El agente de formación de imágenes puede ser una sustancia ecogénica (ya sea líquido o gas), isótopo no metálico, un indicador óptico, un absorbente de neutrones de boro, un ion metálico paramagnético, un metal ferromagnético, un radioisótopo que emite radiación gamma, un radioisótopo emisor de positrones o un absorbente de rayos x. Sin desear quedar ligado a una teoría alguna, un agente de formación de imágenes permite el seguimiento de una composición que comprende un agente de formación de imágenes de este tipo.

Los indicadores ópticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, indicadores fluorescentes y grupos quimioluminiscentes. Se conoce en la técnica una amplia diversidad de colorantes indicadores fluorescentes. Normalmente, el fluoróforo es un compuesto aromático o heteroaromático y puede ser un pireno, antraceno, naftaleno, acridina, estilbeno, indol, benzoindol, oxazol, tiazol, benzotiazol, cianina, carbocianina, salicilato, antranilato, cumarina, fluoresceína, rodamina u otro compuesto similar. Los indicadores fluorescentes adecuados incluyen colorantes de xanteno, tales como los colorantes fluoresceína o rodamina, incluyendo, pero no limitados a, colorantes Alexa Fluor™ (InvitrogenCorp; Carlsbad, CA), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Verde de Oregón-TM, rodamina, Rojo Texas, isotiocianato de tetraarrodamina (TRITC), 5-carboxifluoresceína (FAM), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), tetraclorofluoresceína (TET), 6-carboxi-rodamina (R6G), N,N,N,N'-tetrametil-6-carboxi-rodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX). Los indicadores fluorescentes adecuados incluyen también los colorantes de naftilamina que tienen un grupo amino en la posición alfa o beta. Por ejemplo, los compuestos de naftilamino incluyen 1-dimetilamino-naftil-5-sulfonato, sulfonato de 1-anilino-8-naftaleno, sulfonato de 2-p-toluidinil-6-naftaleno y ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS). Otros colorantes indicadores fluorescentes incluyen cumarinas, tales como 3-fenil-7-isocianatocumarina; acudinas, tales como 9-isotiocianatoacridina y naranja de acridina; N-(p(2-benzoxazolil)fenil)maleimida; cianinas, tales como Cy2, indodicarbocianina 3 (Cy3), indodicarbocianina 5 (Cy5), indodicarbocianina 5.5 (Cy5.5), 3-(-carboxi-pentil)-3'etil-5,5'-dimetiloxacarbocianina (CyA); 1H,5H,11H,15H-Xantenol[2,3,4-ij:5,6,7-i'j']diquinolizina-18-io, 9-[2(o 4)-[[[6-[2,5-dioxo-1-pirrolidinil]oxi]-6-oxohexil]amino]sulfonil]-4(o 2)-sulfonil]-2,3,6,7,12,13,16,17octahidro-sal interna (TR o Rojo Texas); Colorantes BODIPY™; benzoxadiazoles; estilbenos; pirenos; y similares. Muchas formas adecuadas de estos compuestos fluorescentes están disponibles y pueden utilizarse.

Los ejemplos de proteínas fluorescentes adecuadas para uso como agentes de formación de imágenes incluyen, pero no se limitan a, la proteína fluorescente verde, proteína fluorescente roja (por ejemplo, DsRed), proteína fluorescente amarilla, proteína fluorescente cian, proteína fluorescente azul y variantes de las mismas (véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 6.403. 374. 6.800.733 y 7.157.566). Los ejemplos específicos de variantes de GFP incluyen, pero no se limitan a, GFP potenciada (EGFP), EGFP desestabilizada, las variantes de GFP descritas en Doan et al, *Mol. Microbiol.*, 55: 1767-1781 (2005), la variante de GFP descrita en Crameri et al, *Nat. Biotechnol.*, 14: 315319 (1996), las proteínas fluorescentes cerúleas que se describen en Rizzo et al, *Nat. Biotechnol.*, 22: 445 (2004) y Tsien, *Annu. Rev. Biochem.*, 67: 509 (1998) y la proteína fluorescente amarilla descrita en Nagal et al, *Nat. Biotechnol.*, 20: 87-90 (2002). Se describen variantes de DsRed en, por ejemplo, Shaner et al, *Nat. Biotechnol.*, 22: 1567-1572 (2004) e incluyen mStrawberry, mCherry, Morange, mBanana, mHoneydew y mTangerine. Se describen variantes adicionales DsRed en, por ejemplo, Wang et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 101: 16745-16749 (2004) e incluyen mRaspberry y mPlum. Otros ejemplos de variantes de DsRed incluyen mRFPmars descritas en Fischer et al, *FEBS Lett.*, 577: 227-232 (2004) y mRF-Pruby descrita en Fischer et al, *FEBS Lett.*, 580: 2495-2502 (2006).

Los gases ecogénicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, un hexafluoruro de azufre o gas de perfluorocarbono, tal como perfluorometano, perfluoroetano, perfluoropropano, perfluorobutano, perfluorociclobutano, perfluoropentano o perfluorohexano.

Los isótopos no metálicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ^{11}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{18}F , ^{123}I , ^{124}I y ^{125}I . Los radioisótopos adecuados incluyen, pero no se limitan a, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{95}Tc , ^{111}In , ^{62}Cu , ^{64}Cu , Ga, ^{68}Ga y ^{153}Gd . Los iones metálicos paramagnéticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, Gd(III), Dy(III), Fe(III) y Mn(II). Los absorbentes de rayos X adecuados incluyen, pero no se limitan a, Re, Sm, Ho, Lu, Pm, Y, Bi, Pd, Gd, La, Au, Au, Yb, Dy, Cu, Rh, Ag y Ir. En algunas realizaciones, el radionúclido se une a un agente quelante o agente quelante-enlazador unido al agregado. Los radionúclidos adecuados para la conjugación directa incluyen, sin limitación, ^{18}F , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I y mezclas de los mismos. Los radionúclidos adecuados para su uso con un agente quelante incluyen, sin limitación, ^{47}Sc , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{89}Sr , ^{86}Y , ^{87}Y , ^{90}Y , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{117}mSn , ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At , ^{212}Bi y mezclas de los mismos. Los agentes quelantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, DOTA, BAD, TETA, DTPA, EDTA, NTA, HDTA, sus análogos de fosfonato y mezclas de los mismos. Un experto en la materia estará familiarizado con los métodos para la fijación de radionúclidos, agentes quelantes y agentes quelantes-enlazadores a las partículas.

Una respuesta detectable se refiere generalmente a un cambio en, o en la aparición de, una señal que es detectable, ya sea por observación o instrumentalmente. En ciertos casos, la respuesta detectable es fluorescencia o un cambio en la fluorescencia, por ejemplo, un cambio en la intensidad de la fluorescencia, la excitación de la fluorescencia o la distribución de la longitud de onda de emisión, la duración de la fluorescencia y/o la polarización de la fluorescencia. Un experto en la materia apreciará que el grado y/o ubicación del marcador en un sujeto o muestra puede compararse con un patrón o control (por ejemplo, tejido u órgano sano). En algunos otros casos, la respuesta detectable es la radiactividad (es decir, radiación), que incluye partículas alfa, partículas beta, nucleones, electrones, positrones, neutrinos y gamma rayos emitidos por una sustancia radiactiva tal como un radionúclido.

Los dispositivos específicos o métodos conocidos en la técnica para la detección in vivo de la fluorescencia, por ejemplo, de fluoróforos o proteínas fluorescentes, incluyen, pero no se limitan a, fluorescencia in vivo cercana al infrarrojo (véase, por ejemplo, Frangioni, *Curr. Opin. Chem Biol.*, 7: 626-634 (2003)), el sistema de formación de imágenes por fluorescencia in vivo Maestro™ (Cambridge Research & Instrumentation, Inc.; Woburn, Massachusetts), formación de imágenes por fluorescencia in vivo utilizando un explorador de punto móvil in situ (véase, por ejemplo, Ramanujam et al, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering.*, 48: 1034-1041 (2001) y similares. Otros métodos o dispositivos para la detección de una respuesta óptica incluyen, sin limitación, la inspección visual, cámaras CCD, cámaras de vídeo, película fotográfica, dispositivos de exploración láser, fluorómetros, fotodiodos, contadores cuánticos, microscopios de epifluorescencia, microscopios de barrido, citómetros de flujo, lectores de microplacas de fluorescencia o amplificación de la señal utilizando tubos fotomultiplicadores.

Cualquier dispositivo o método conocido en la técnica para detectar las emisiones radiactivas de radionúclidos en un sujeto es adecuado para su uso en la presente invención. Por ejemplo, métodos tales como la Tomografía Computarizada por emisión de fotones individuales (SPECT), que detecta la radiación de un solo fotón de radionúclido emisor-gamma utilizando una cámara gamma de rotación, y centellografía de radionúclidos, obteniendo una imagen o serie de imágenes secuenciales de la distribución de un radionúclido en los tejidos, órganos o sistemas del cuerpo utilizando una cámara de centelleo gamma, puede utilizarse para detectar la radiación emitida desde un agregado radiomarcado. La tomografía por emisión de positrones (PET) es otra técnica adecuada para la detección de la radiación en un sujeto.

En algunas realizaciones, el ligando es un ligando receptor de la superficie celular. Como se usa en el presente documento, un "ligando de receptor de la superficie celular" se refiere a una molécula que puede unirse a la superficie exterior de una célula. Un ligando de receptor de superficie celular de ejemplo incluye, por ejemplo, un péptido que se une a un receptor de la superficie celular, un glucopéptido que se une a un receptor de la superficie celular, una proteína que se une a un receptor de la superficie celular, una glucoproteína que se une a un receptor de la superficie celular, un compuesto orgánico que se une a un receptor de la superficie celular y un fármaco que se une a un receptor de la superficie celular.

Los ligandos de un receptor de la superficie celular incluyen, pero no se limitan a, citocinas, factores de crecimiento, hormonas, anticuerpos y factores angiogénicos.

En algunas realizaciones, el ligando de un receptor de la superficie celular es transferrina o EGF.

Los ligandos que proporcionan una afinidad potenciada para una diana seleccionada también se denominan ligandos dirigidos en el presente documento. Como se usa en el presente documento, la expresión "ligando dirigido" se refiere a una molécula que se une o interactúa con una molécula diana. Normalmente, la naturaleza de la interacción o unión es no covalente, por ejemplo, mediante interacciones de hidrógeno, electrostáticas o de van der Waals, sin embargo, la unión también puede ser covalente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ligando endosomolítico" se refiere a moléculas que tienen propiedades endosomolíticas. Los ligandos endosomolíticos promueven la lisis de y/o el transporte de la composición de la invención o sus componentes, de los compartimientos celulares tales como el endosoma, lisosomas, retículo endoplasmático (RE), aparato de Golgi, microtúbulos, peroxisomas u otros cuerpos vesiculares dentro de la célula, al citoplasma de la célula. Algunos ligandos endosomolíticos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, imidazoles, poli u oligoimidazoles, polietileniminas lineales o ramificadas (PEI), poliaminas lineales y ramificadas, por ejemplo, la espermina, poliaminas lineales y ramificadas catiónicas, policarboxilatos, policationes, oligo o poli cationes o aniones enmascarados, acetales, poliacetales, cetales/policetales, ortoésteres, polímeros lineales o ramificados con cargas catiónicas o aniónicas enmascarados o sin enmascarar, dendrímeros con tensioactivos catiónicos enmascarados o sin enmascarar o cargas aniónicas, péptidos polianiónicos, peptidomiméticos polianiónicos, péptidos sensibles al pH, lípidos fusogénicos naturales y sintéticos, lípidos catiónicos naturales y sintéticos.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "modulación FC del ligando" y "moduladores FC" se refieren a moléculas que pueden modular la farmacocinética de la composición de la invención. Algunos moduladores FC de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, moléculas lipófilas, ácidos biliares, esteroides, análogos de fosfolípidos, péptidos, agentes de unión a proteínas, vitaminas, ácidos grasos, fenoxazina, aspirina, naproxeno,

ibuprofeno, suprofen, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, PEG, biotina y ligandos de unión a transtiretina (por ejemplo, ácido tetraiodotiroacético, 2, 4, 6-triyodofenol y ácido flufenámico).

En algunas realizaciones, un péptido anfifílico comprende al menos un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más) ligando conjugado. Cuando dos o más ligandos están presentes, los ligandos pueden tener todas las mismas propiedades, tener todos diferentes propiedades o algunos ligandos tienen las mismas propiedades mientras que otros tienen propiedades diferentes. Por ejemplo, un ligando puede tener propiedades de dirección, tener una actividad endosomolítica o tener propiedades de modulación de la FC. En consecuencia, los dos o más ligandos pueden ser el mismo ligando, diferentes ligandos, el mismo tipo de ligando (por ejemplo, ligando de dirección, ligando endosomolítico, modulador de FC), diferentes tipos de ligando o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, todos los ligandos tienen diferentes propiedades.

En algunas realizaciones, el péptido anfifílico comprende un polímero hidrófilo seleccionado entre el grupo que consiste en poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), poli(propilenglicol), poli(óxido de etileno-co-óxido de propileno), ácido hialurónico, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), heparina, polivinil(pirrolidona), sulfato de condroitano, quitosano, glucosaminoglicanos, dextrano, dextrina, sulfato de dextrano, acetato de celulosa, carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, celulósicos, poli(trimetilenglicol), poli(tetrametilenglicol), polipéptidos, poliacrilamida, poliacrilamida, polietilenamina), poli(alil amina) y mezclas de los mismos y en el que el polímero hidrófilo está unido covalentemente con el segmento de peptidilo hidrófobo.

Unión a péptidos

Una molécula (por ejemplo, un ligando) puede conjugarse con un péptido usando cualquiera de diversos métodos conocidos por los expertos en la materia. La molécula puede ser acoplarse o conjugarse con el péptido de manera covalente o no covalente. El enlace covalente entre la molécula y el péptido puede estar mediada por un enlazador. El enlace no covalente entre la molécula y el péptido puede estar basado en interacciones iónicas, interacciones de van der Waals, interacciones dipolo-dipolo, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas y/o interacciones de reconocimiento de forma.

Sin limitaciones, los ligandos pueden acoplarse a un péptido en diversos sitios, por ejemplo, el extremo N, el extremo C y/o en una posición interna (por ejemplo, cadena lateral de un aminoácido). Cuando dos o más ligandos están presentes, el ligando puede estar en extremos opuestos de un péptido (por ejemplo, extremo N y extremo C).

Generalmente, el ligando se encuentra en el extremo terminal (por ejemplo, en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 a contar desde el extremo) que está más lejos del segmento de peptidilo hidrófobo. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, esto permite que el ligando esté en la posición o cerca de la superficie de una partícula formada por autoagregación de los péptidos anfifílicos.

En algunas realizaciones, un ligando se encuentra en el extremo del segmento de peptidilo hidrófilo que no está unido con el segmento de peptidilo hidrófobo. Por ejemplo, si el extremo N del segmento de peptidilo hidrófilo está unido al segmento de peptidilo hidrófobo, entonces, el ligando se encuentra en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 contando desde extremo C del segmento de peptidilo hidrófilo. Como alternativa, si el extremo C del segmento de peptidilo hidrófilo está unido al segmento de peptidilo hidrófobo, entonces, el ligando se encuentra en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 contando a partir del extremo N del segmento de peptidilo hidrófilo.

En algunas realizaciones, el ligando se une al péptido a través de un enlazador. El ligando puede estar presente en un monómero cuando dicho monómero se incorpora en un péptido durante la síntesis. En algunas realizaciones, el ligando puede incorporarse a través del acoplamiento a un monómero "precursor" después de que dicho monómero "precursor" se ha incorporado en el péptido. Por ejemplo, un monómero que tiene, por ejemplo, un enlazador terminado en amino (es decir, que no tiene ningún ligando asociado) puede incorporarse en el péptido, por ejemplo, monómero-enlazador-NH₂. En una operación posterior, es decir, después de la incorporación del monómero precursor en el péptido, un ligando que tiene un grupo electrófilo, por ejemplo, un éster de pentafluorofenilo o grupo aldehído, puede posteriormente unirse al monómero precursor mediante el acoplamiento del grupo electrófilo del ligando con el grupo nucleófilo terminal de la cadena del monómero precursor. En otro ejemplo no limitante, un ligando que tiene un grupo electrófilo puede conectarse a un extremo N, extremo C o un grupo amino de cadena lateral interior. En otro ejemplo, un ligando que comprende tiol puede unirse a un péptido mediante un enlazador disulfuro cuando el péptido comprende una cisteína.

Enlazadores

Como se usa en el presente documento, el término "enlazador" significa un resto orgánico que conecta dos partes de un compuesto. Los enlazadores comprenden normalmente un enlace directo o un átomo tal como oxígeno o azufre, una unidad tal como NH, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH, SS o una cadena de átomos, tales como alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alquínilo C₂-C₆ sustituido o sin sustituir, alquínilo C₂-C₆ sustituido o sin sustituir, arilo C₆-C₁₂ sustituido o sin sustituir, heteroarilo C₅-C₁₂ sustituido o sin sustituir, heterocíclico C₅-C₁₂ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo C₃-C₁₂ sustituido o sin sustituir, en el que uno o más metilenos pueden interrumpirse o estar

terminados en O, S, S(O), SO₂, NH, C(O).

En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador ramificado. El punto de ramificación del enlazador ramificado puede ser al menos trivalente, pero puede ser un átomo tetravalente, pentavalente o hexavalente o un grupo que presente dichos múltiples valencias. En algunas realizaciones, el punto de ramificación es -N, -N(R)-C, -O-C, -S-C, -SS-C, -C(O)N(R)-C, -OC(O)N(R)-C, -N(R)C(O)-C o -N(R)C(O)OC; en los que R es independientemente para cada aparición H o alquilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, el punto de ramificación es glicerol o un derivado del mismo.

En algunas realizaciones, el enlazador comprende un grupo de unión escindible. Como se usa en el presente documento, un "grupo de unión escindible" es un resto químico que es suficientemente estable fuera de la célula, pero que tras la entrada en una célula diana se escinde para liberar las dos partes del enlazador que está manteniendo juntas. En una realización preferida, el grupo de unión escindible se escinde al menos 10 veces o más, preferentemente al menos 100 veces más rápido en la célula diana o en una primera condición de referencia (que, por ejemplo, puede seleccionarse para imitar o representar las condiciones intracelulares) que en la sangre o suero de un sujeto, o en una segunda condición de referencia (que, por ejemplo, puede seleccionarse para imitar o representar condiciones que se encuentran en la sangre o suero).

Los grupos de unión escindibles son susceptibles a los agentes de escisión, por ejemplo, pH, potencial redox o la presencia de moléculas de degradación. Generalmente, los agentes de escisión son más frecuentes o se encuentran a niveles o actividades más altos dentro de las células que en el suero o la sangre. Los ejemplos de dichos agentes de degradación incluyen: agentes redox que se seleccionan para sustratos particulares o que no tienen especificidad por el sustrato, incluyendo, por ejemplo, enzimas oxidantes o reductoras o agentes reductores tales como mercaptanos, presentes en las células, que pueden degradar un grupo de unión escindible por redox mediante reducción; esterasas; amidasas; endosomas o agentes que pueden crear un ambiente ácido, por ejemplo, los que dan como resultado un pH de cinco o inferior; enzimas que pueden hidrolizar o degradar un grupo de unión escindible por ácido actuando como un ácido general, peptidasas (que puede ser el sustrato específico) y proteasas, y fosfatasas.

Un enlazador puede incluir un grupo de unión escindible que es escindible por una enzima particular. El tipo de grupo de unión escindible incorporado en un enlazador puede depender de la célula a la que se dirige. Por ejemplo, para la dirección al hígado, los grupos de unión escindibles pueden incluir un grupo éster. Las células del hígado son ricas en esterasas y por tanto el enlazador se escinde de manera más eficiente en las células hepáticas que en tipos de células que no sean ricas en esterasas. Otros tipos de células ricas en esterasas incluyen las células de los pulmones, la corteza renal y los testículos.

Los enlazadores que contienen enlaces peptídicos pueden utilizarse cuando se dirigen a tipos de células ricas en peptidasas, tales como las células del hígado y los sinoviocitos.

En algunas realizaciones, el grupo de unión escindible se escinde al menos 1,25, 1,5, 1,75, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50 o 100 veces más rápido en la célula (o en condiciones in vitro seleccionadas para imitar las condiciones intracelulares) en comparación con la sangre o el suero (o en condiciones in vitro seleccionadas para imitar las condiciones extracelulares). En algunas realizaciones, el grupo de unión escindible se escinde menos del 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % o 1 % en la sangre (o en condiciones in vitro seleccionadas para imitar las condiciones extracelulares) en comparación con las condiciones en la célula (o en condiciones in vitro seleccionadas para imitar las condiciones intracelulares).

Los grupos de unión escindibles de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, grupos de unión escindibles por redox (por ejemplo, -SS- y -C(R)₂-S-S-, en los que R es H o alquilo C₁-C₆ y al menos un R es alquilo C₁-C₆ tal como CH₃ o CH₂CH₃); grupos de unión escindibles a base de fosfato (por ejemplo -O-P(O)(OR)-O-, -O-P(S)(OR)-O-, -O-P(S)(SR)-O-, -S-P(O)(OR)-O-, -OP(O)(OR)-S-, -S-P(O)(OR)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(OR)-O-, -O-P(O)(R)-O-, -O-P(S)(R)-O-, -S-P(O)(R)-O-, -SP(S)(R)-O-, -S-P(O)(R)-S-, -O-P(S)(R)-S-, -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -OP(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -SP(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S- y -O-P(S)(H)-S-, en los que R es alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado opcionalmente sustituido); grupos de unión escindibles por ácido (por ejemplo, hidrazonas, ésteres y ésteres de aminoácidos, -C=NN y -OC(O)-); grupos de unión escindibles a base de ésteres (por ejemplo, -C(O)O-); grupos de unión escindibles a base de péptidos, (por ejemplo, grupos que se escinden por enzimas como peptidasas y proteasas en las células, por ejemplo, -NHCHR^AC(O)NHCHR^BC(O)-, donde R^A y R^B son los grupos R de los dos aminoácidos adyacentes). Un grupo de unión escindible a base de péptidos comprende dos o más aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlace de escisión a base de péptidos comprende la secuencia de aminoácidos que es el sustrato para una peptidasa o una proteasa que se encuentra en las células.

En algunas realizaciones, un grupo de unión escindible por ácido es escindible en un ambiente ácido con un pH de aproximadamente 6,5 o inferior (por ejemplo, aproximadamente 6,0, 5,5, 5,0 o menor) o por agentes tales como enzimas que pueden actuar como un ácido general.

Además de enlaces covalentes, dos partes de un compuesto pueden estar unidas entre sí por un par de unión por afinidad. La expresión "par de unión por afinidad" o "par de unión" se refiere a primeras y segundas moléculas que se unen específicamente entre sí. Un miembro del par de unión se conjuga con la primera parte que se va a unir mientras que el segundo miembro se conjuga con la segunda parte que se va a unir. Como se usa en el presente documento, la expresión "unión específica" se refiere a la unión del primer miembro del par de unión al segundo miembro del par de unión con mayor afinidad y especificidad que a otras moléculas.

Los pares de unión de ejemplo incluyen cualquier compuesto hapténico o antigénico en combinación con un anticuerpo correspondiente o porción o fragmento de unión del mismo (por ejemplo, digoxigenina y anti-digoxigenina, inmunoglobulina de ratón e inmunoglobulina de cabra anti-ratón) y pares de unión no inmunológicos (por ejemplo, biotina-avidina, biotina-estreptavidina, hormona [por ejemplo, tiroxina y proteína de unión a hormona cortisol, receptor-agonista del receptor, receptor-antagonista del receptor (por ejemplo, receptor de acetilcolina-acetilcolina o un análogo del mismo), IgG-proteína A, lectina-carbohidrato, enzima-cofactor de la enzima, enzima-inhibidor de la enzima y pares de oligonucleótidos complementarios capaces de formar ácidos nucleicos bicatenarios) y similares. El par de unión también puede incluir una primera molécula que está cargada negativamente y una segunda molécula que está cargada positivamente.

Un ejemplo del uso de la conjugación del par de unión es la conjugación de biotina-avidina o biotina-estreptavidina. En este enfoque, una de las moléculas o el péptido están biotinilados y el otro está conjugado con avidina o estreptavidina. Muchos kits comerciales también están disponibles para moléculas de biotinilación, tales como las proteínas.

Otro ejemplo del uso de la conjugación del par de unión es el método de biotina-sándwich. Véase, por ejemplo, Davis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103: 8155-60 (2006). Las dos moléculas que se van a conjugar juntas se biotinilan y después se conjugar entre sí utilizando estreptavidina tetravalente como enlazador.

Otro ejemplo más del uso de la conjugación del par de unión es la conjugación de ácido nucleico bicatenario. En este enfoque, la primera parte que se va a unir se conjuga con una primera cadena del ácido nucleico bicatenario y la segunda parte que se va a unir se conjuga con la segunda cadena del ácido nucleico bicatenario. Los ácidos nucleicos pueden incluir, sin limitación, segmentos de secuencia definidos y secuencias que comprenden nucleótidos, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, análogos de nucleótidos, nucleótidos modificados y nucleótidos que comprenden modificaciones de la cadena principal, puntos de unión y restos no nucleotídicos, grupos o puentes.

Partículas de péptido

El inventor también ha descubierto que los péptidos anfífilos que se describen en el presente documento se someten a la auto-agregación para formar agregados supramoleculares. Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona partículas de péptidos que comprenden un péptido anfífilo que se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la partícula de péptidos comprende una pluralidad de péptidos anfífilos que se describen en el presente documento. Por ejemplo, una partícula de péptidos puede comprender al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 75, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 150, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 750, al menos aproximadamente 1000, al menos aproximadamente 2500, al menos aproximadamente 5000, al menos aproximadamente 10000 o más péptidos anfífilos que se describen en el presente documento. La pluralidad de péptidos anfífilos presentes en una partícula de péptidos puede comprender una realización de un péptido anfífilo que se describe en el presente documento o al menos dos realizaciones diferentes de un péptido anfífilo que se describe en el presente documento.

El término "partícula" incluye esferas; nanobastones; y prismas. Las partículas de péptidos que se describen en el presente documento difieren de micelas, liposomas y otras partículas que comprenden una cubierta distinta (por ejemplo, una capa de lípidos), que sirve como material de formación de la pared, que rodea los medios encapsulados situados dentro de la cubierta. Las partículas que se describen en el presente documento son partículas sólidas. Las partículas pueden ser, por ejemplo, monodispersas o polidispersas y la variación en el diámetro de las partículas de una dispersión dada puede variar. Sin embargo, puesto que pueden obtenerse péptidos anfífilos de un tamaño uniforme, las partículas que se describen en el presente documento generalmente son monodispersas. En consecuencia, en algunas realizaciones, el diámetro de una partícula se describe en el presente documento está dentro de $\pm$ el 2,5 %, dentro de $\pm$ el 5 %, dentro de $\pm$ el 10 %, dentro de $\pm$ el 15 %, dentro de $\pm$ el 20 %, dentro de $\pm$ el 25 %, dentro de $\pm$ el 30 % o dentro de $\pm$ el 35 % del diámetro medio.

En algunas realizaciones, una partícula de péptidos que se describe en el presente documento es una nanopartícula. Como se usa en el presente documento, el término "nanopartículas" se refiere a partículas que son del orden de 10^{-9} o una mil millonésima parte de un metro y por debajo de 10^{-6} o 1 millonésima parte de un metro de tamaño.

En general, las partículas de péptidos tienen un diámetro medio de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 5000 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro medio de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 2500 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro medio de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 2000 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro medio de aproximadamente 150 nm a aproximadamente 1700 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro medio de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 1500 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro medio de aproximadamente 260 nm. En una realización, las partículas tienen un diámetro medio de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 150 nm. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, el tamaño de partícula puede modularse cambiando la concentración del péptido anfifílico en la solución utilizada para la fabricación de las partículas de péptidos.

En algunas realizaciones, una partícula de péptidos que se describe en el presente documento comprende una mezcla de péptidos anfifílicos totalmente enmascarados y péptidos anfifílicos parcialmente o no enmascarados. Como se usa en el presente documento un "péptido no enmascarado" se refiere a un péptido anfifílico en el que ninguno del grupo amino del extremo N y los grupos amino de la cadena lateral en el segmento de peptidilo hidrófilo se conjuga con un grupo protector de nitrógeno o de amino.

Cambiando la relación de péptidos totalmente enmascarados a parcialmente enmascarados o no enmascarados, la carga neta de la partícula de péptidos puede variarse. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, relaciones más altas de péptidos totalmente enmascarados pueden aumentar la estabilidad de las partículas, mientras que relaciones más altas de péptidos parcialmente y/o no enmascarados pueden aumentar la carga de las moléculas que llevan cargas aniónicas (por ejemplo, ácidos nucleicos, tales como ADN o ARN incluyendo ARNip) y una mayor capacidad para penetrar una membrana celular.

En algunas realizaciones, la partícula de péptidos puede comprender un péptido anfifílico totalmente enmascarado (por ejemplo, un péptido anfifílico totalmente acetilado). La expresión "péptido anfifílico totalmente acetilado" como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido anfifílico en el que se acetilan todos, el grupo amino del extremo N y los grupos amino de la cadena lateral, en el segmento de peptidilo hidrófilo.

En algunas realizaciones, la partícula de péptidos puede comprender una mezcla de péptidos totalmente enmascarados (por ejemplo, totalmente acetilados) y parcialmente enmascarados (por ejemplo, parcialmente acetilados). Como se usa en el presente documento, la expresión "péptido anfifílico parcialmente acetilado" se refiere a un péptido anfifílico en el que al menos uno del grupo amino del extremo N y los grupos amino de la cadena lateral en el segmento de peptidilo hidrófilo se acetila, pero no todos ellos. En algunas realizaciones un péptido anfifílico parcialmente acetilado puede tener el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico acetilado, pero no cualquiera de los grupos amino de la cadena lateral en el segmento de peptidilo hidrófilo. En algunas realizaciones, un péptido anfifílico parcialmente acetilado puede tener al menos uno (incluyendo al menos dos o más) de los grupos amino de la cadena lateral en el segmento de peptidilo hidrófilo acetilado, pero no el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico. En algunas realizaciones, un péptido anfifílico parcialmente acetilado puede tener tanto el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico y al menos uno (incluyendo al menos dos o más), pero no todos, de los grupos amino de la cadena lateral en el peptidilo hidrófilo segmento acetilado.

En algunas realizaciones, la partícula de péptidos puede comprender una mezcla de péptidos anfifílicos totalmente enmascarados (por ejemplo, totalmente acetilados) y no enmascarados (por ejemplo, no acetilados). Como se usa en el presente documento, la expresión "péptido anfifílico no acetilado" se refiere a un péptido anfifílico en el que no se acetila ninguno entre el grupo amino del extremo N y los grupos amino de la cadena lateral en el segmento de peptidilo hidrófilo. En algunas realizaciones, la partícula de péptidos puede comprender una mezcla de péptidos anfifílicos totalmente enmascarados (por ejemplo, completamente acetilados), parcialmente enmascarados (por ejemplo, parcialmente acetilados) y no enmascarados (por ejemplo, no acetilados).

En algunas realizaciones, la partícula de péptidos no comprende un péptido anfifílico completamente enmascarado, por ejemplo, la partícula comprende péptidos anfifílicos parcialmente enmascarados o una mezcla de péptidos parcialmente enmascarados. En algunas realizaciones, la partícula de péptidos comprende una mezcla de péptidos parcialmente enmascarados y no enmascarados.

Sin limitaciones, la relación de péptidos totalmente enmascarados a parcialmente enmascarados o péptidos no enmascarados en la partícula de péptidos puede variar de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 1:100. En algunas realizaciones, la relación de péptidos totalmente enmascarados a parcialmente enmascarados o péptidos no enmascarados en las partículas de péptidos varía de aproximadamente 95:5 a aproximadamente 1:1.

Las partículas que se describen en el presente documento pueden utilizarse para la administración de fármacos. Por tanto, puede incluirse una amplia diversidad de agentes terapéuticos en las partículas que se describen en el presente documento. En consecuencia, en algunas realizaciones, una partícula de péptidos que se describe en el presente documento puede comprender un principio activo que se describe en el presente documento. Un principio activo puede estar unido covalentemente con un componente, por ejemplo, un péptido anfifílico, de la partícula de péptidos. En algunas realizaciones, el principio activo en la partícula de péptidos que se describe en el presente

documento no está unido covalentemente a un componente de la partícula. Sin limitaciones, el principio activo puede estar absorbido/adsorbido en la superficie de la partícula, encapsulado en la partícula o distribuido (homogénea o no homogénea) a través de la partícula.

- 5 En general, cualquier relación de principio activo a péptidos anfifílicos puede estar presente en la partícula de péptidos que se describe en el presente documento. En consecuencia, en algunas realizaciones, la relación del principio activo a los péptidos anfifílicos varía de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 1:100.000. En algunas realizaciones, la relación del principio activo a los péptidos anfifílicos varía de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:100.000. En algunas realizaciones, la relación del principio activo a los péptidos anfifílicos varía de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:10.000. En algunas realizaciones, la relación del principio activo a los péptidos anfifílicos varía de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:1000. En algunas realizaciones, la relación del principio activo a los péptidos anfifílicos varía de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:100. En algunas realizaciones, la relación del principio activo a los péptidos anfifílicos varía de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:10. En algunas realizaciones, la relación del principio activo a los péptidos anfifílicos varía de aproximadamente 50:1 a aproximadamente 1:500. En algunas realizaciones, la relación del principio activo a los péptidos anfifílicos varía de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:25.

- 20 En algunas realizaciones, la partícula de péptidos puede comprender un ligando. Sin limitaciones, un ligando puede estar unido covalentemente con un componente, por ejemplo, un péptido anfifílico, de las partículas. En algunas realizaciones, un ligando no está unido covalentemente a un componente de la partícula, por ejemplo, el ligando se absorbe/adsorbe en la superficie de la partícula, el ligando se encapsula en la partícula o el ligando se distribuye (homogénea o no homogéneamente) en toda de la partícula. En algunas realizaciones, el ligando es un ligando de dirección.

- 25 En algunas realizaciones, el ligando forma una capa en la superficie de la partícula de péptidos, por ejemplo, el ligando forma una corona alrededor de la partícula. Cuando el ligando forma una capa en la superficie de la partícula, el espesor de la capa puede variar de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm. En algunas realizaciones, el espesor de la capa es de aproximadamente 10 nm.

- 30 En general, cualquier relación de un ligando a los péptidos anfifílicos puede estar presente en la partícula. En consecuencia, en algunas realizaciones, la relación del ligando a los péptidos anfifílicos varía de aproximadamente 1000:1 a aproximadamente 1:1.000.000. En algunas realizaciones, la relación del ligando a los péptidos anfifílicos varía de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:1.000.000. En algunas realizaciones, la relación del ligando a los péptidos anfifílicos varía de aproximadamente 500:1 a aproximadamente 1:500. En algunas realizaciones, la relación del ligando a los péptidos anfifílicos varía de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 1:250. En algunas realizaciones, la relación del ligando a los péptidos anfifílicos varía de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:1000.

- 40 En algunas realizaciones, una partícula de péptidos puede comprender tanto un principio activo (por ejemplo, un agente terapéutico) como un ligando. En algunas realizaciones, una partícula de péptidos puede comprender un principio activo (por ejemplo, un agente terapéutico) distribuido dentro de la partícula y un ligando en la superficie exterior de la partícula.

- 45 Sin limitaciones, pueden fabricarse diferentes tipos de partículas de péptidos, por ejemplo, (1) partículas formadas a partir de péptidos anfifílicos solamente; (2) partículas formadas a partir de los péptidos anfifílicos a las que una molécula de interés, por ejemplo, un principio activo o un ligando, se absorbe/adsorbe o forma un recubrimiento sobre un núcleo de péptidos anfifílicos; (3) partículas formadas a partir de un núcleo formado por una molécula de interés, por ejemplo, un principio activo o un ligando, que se recubre con una capa de péptidos anfifílicos; (4) partículas formadas a partir de péptidos anfifílicos a los que una molécula de interés, por ejemplo, un principio activo o un ligando, se une de forma covalente; (5) partículas formadas a partir de una mezcla de una molécula de interés (por ejemplo, un principio activo o un ligando) y péptidos anfifílicos; y (6) partículas formadas de manera que comprendan una mezcla generalmente homogénea de una molécula de interés, por ejemplo, un principio activo o un ligando con péptidos anfifílicos o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, una partícula de péptidos puede formarse a partir de los péptidos anfifílicos en los que una primera molécula de interés, por ejemplo, un principio activo o un ligando, se absorbe/adsorbe o forma un revestimiento sobre un núcleo de péptidos anfifílicos, en los que el núcleo de los péptidos anfifílicos comprende además una segunda molécula de interés, por ejemplo, un principio activo. En estas realizaciones, la segunda molécula de interés puede ser igual o diferente de la primera molécula de interés.

- 60 En algunas realizaciones, una partícula de péptidos puede comprender adicionalmente un polímero, por ejemplo, un polímero biocompatible. Como se usa en el presente documento, el término "biocompatible" significa la exposición de esencialmente ninguna citotoxicidad o inmunogenicidad mientras está en contacto con fluidos o tejidos corporales. Como se usa en el presente documento, el término "polímero" se refiere a oligómeros, co-oligómeros, polímeros y copolímeros, por ejemplo, de bloques al azar, de bloques múltiples, estrella, injertados, copolímeros de gradiente y combinación de los mismos.

La expresión "polímero biocompatible" se refiere a polímeros que son no tóxicos, químicamente inertes y sustancialmente no inmunógenos cuando se utilizan internamente en un sujeto y que son sustancialmente insolubles en la sangre. El polímero biocompatible puede ya sea no biodegradable o, preferentemente, biodegradable. Preferentemente, el polímero biocompatible es también no inflamatoria cuando se emplea *in situ*.

Se desvelan polímeros biodegradables en la técnica. Los ejemplos de polímeros biodegradables adecuados incluyen, pero no se limitan a, polímeros de cadena lineal tales como poliláctidos, poliglicólidos, policaprolactonas, copolímeros de ácido poliláctico y ácido poliglicólico, polianhídridos, poliépsilon caprolactona, poliamidas, poliuretanos, poliesteramidas, poliortoésteres, polidioxanonas, poliacetales, policetales, policarbonatos, poliortocarbonatos, polidihidropiranos, polifosfacenos, polihidroxibutiratos, polihidroxicvaleratos, oxalatos de polialquileño, succinatos de polialquileño, poli(ácido málico), poli(aminoácidos), polivinilpirrolidona, polietilenglicol, polihidroxixelulosa, metacrilato de polimetilo, quitina, quitosano, copolímeros de ácido poliláctico y ácido poliglicólico, poli(sebacato de glicerol) (PGS) y copolímeros, terpolímeros y copolímeros que incluyen uno o más de los anteriores. Otros polímeros biodegradables incluyen, por ejemplo, gelatina, colágeno, seda, quitosano, alginato, celulosa, ácidos poli-nucleicos, etc.

Los polímeros biocompatibles adecuados no biodegradables incluyen, a modo de ejemplo, acetatos de celulosa (incluyendo diacetato de celulosa), polietileno, polipropileno, polibutileno, tereftalato de polietileno (PET), cloruro de polivinilo, poliestireno, poliamidas, nailon, policarbonatos, polisulfuros, polisulfonas, hidrogeles (por ejemplo, acrílicos), poliacrilonitrilo, polivinilacetato, butirato de acetato de celulosa, nitrocelulosa, copolímeros de uretano/carbonato, copolímeros de estireno/ácido maleico, poli(etilenimina), poloxámeros (por ejemplo Pluronic tal como Poloxámeros 407 y 188), ácido hialurónico, heparina, agarosa, pululano y copolímeros que incluyen uno o más de los anteriores, tales como copolímeros de etileno/alcohol vinílico (EVOH).

Las partículas de péptidos también pueden comprender restos adicionales que pueden ampliar la vida útil de las partículas *in vivo*. Por ejemplo, las partículas de péptidos pueden comprender restos funcionales que potencian la vida útil *in vivo* de las partículas en la sangre. Un resto a modo de ejemplo para aumentar la vida útil *in vivo* es el polietilenglicol. En consecuencia, las partículas de péptidos pueden comprender polietilenglicol además del péptido anfifílico.

Realizaciones adicionales de las partículas de péptido

En una realización, una partícula de péptidos que se describe en el presente documento comprende realizaciones particulares de un péptido anfifílico que se describe en el presente documento. El péptido anfifílico presente en esta realización de la partícula de péptidos comprende un segmento de peptidilo hidrófobo y un segmento de peptidilo hidrófilo, en el que el segmento de peptidilo hidrófobo comprende una secuencia de aminoácidos de $(\text{Trp-Leu})_m$ - $(\text{Trp})_n$ o $(\text{Leu-Trp})_p$ -(Leu) $_q$, en las que cada Trp es D-Trp o L-Trp y cada Leu es D-Leu o L-Leu, m y p son independientemente un número entero de 1 a 5 y n y q son independientemente 0 o 1, siempre que cuando Trp es D-Trp entonces Leu es L-Leu, y cuando Trp es L-Trp entonces Leu es D-Leu o viceversa; y en el que el segmento de peptidilo hidrófilo comprende una secuencia de aminoácidos de $(\text{Lys})_r$, en el que r es un número entero de 1 a 15 y en el que la partícula de péptidos comprende además en su superficie exterior un ligando que se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, la partícula de péptidos puede comprender una o más realizaciones de un péptido anfifílico descrito anteriormente en la sección "péptidos anfifílicos de ejemplo". En una realización, la partícula de péptidos puede comprender un péptido anfifílico con una secuencia de aminoácidos de (L-Lys) -(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-X, en la que X está ausente o es NH_2 . Como se ha descrito anteriormente, en algunas realizaciones, al menos uno de los restos de Lys del segmento de peptidilo hidrófilo o el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico están acetilados. En algunas realizaciones, todos los restos de Lys del segmento de peptidilo hidrófilos están acetilados. En algunas realizaciones, el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico y todos los restos de Lys del segmento de peptidilo hidrófilo están acetilados.

El ligando presente en la superficie exterior de la partícula de péptidos puede seleccionarse basándose en los tipos de moléculas diana (por ejemplo, pero no limitados a, células, bacterias, proteínas y/o ácidos nucleicos) a las que se unirá y/o con las que interactuará la partícula de péptidos. Por ejemplo, para facilitar la entrega de una partícula de péptidos que se describe en el presente documento a una célula, puede seleccionarse un ligando específico para el receptor de superficie celular, facilitando así la absorción de la partícula de péptidos por la célula, por ejemplo, a través de endocitosis. Por tanto, algunas realizaciones de las partículas de péptidos que se describen en el presente documento pueden utilizarse para la administración dirigida de cualquier principio activo que se describe en el presente documento usando las partículas de péptidos como excipientes de entrega o vehículos. En una realización, las partículas de péptidos pueden utilizarse para entregar a una célula un principio activo que es impermeable a las células cuando se entrega solo.

Como se ha descrito anteriormente, en algunas realizaciones, la partícula de péptidos puede comprender una mezcla de péptidos anfifílicos totalmente enmascarados (por ejemplo, totalmente acetilados) y parcialmente enmascarados (por ejemplo, parcialmente acetilados) que se describen en el presente documento. En aquellas

realizaciones, la relación de péptidos anfífilos totalmente acetilados a los parcialmente enmascarados puede variar de aproximadamente 95:5 a aproximadamente 1:1. En ciertas realizaciones, la partícula puede comprender además péptidos anfífilos no enmascarados (por ejemplo, no acetilados).

5 En consecuencia, también se proporciona en el presente documento una partícula de péptidos mixta que comprende un péptido anfílico totalmente acetilado y un péptido anfílico parcialmente acetilado o no acetilado. En realizaciones específicas, las partículas de péptidos mixtas comprenden un primer péptido anfílico y un segundo péptido anfílico, en la que el primer y el segundo péptido anfílico comprenden cada uno, independientemente, un segmento de peptidilo hidrófobo y un segmento de peptidilo hidrófilo, en los que el segmento de peptidilo hidrófobo
10 comprende una secuencia de aminoácidos de $(\text{Trp-Leu})_m(\text{Trp})_n$ o $(\text{Leu-Trp})_p(\text{Leu})_q$, en la que cada Trp es D-Trp o L-Trp y cada Leu es D-Leu o L-Leu, m y p son independientemente un número entero de 1 a 5 y n y q son independientemente 0 o 1, a condición de que cuando Trp es D-Trp entonces Leu es L-Leu y cuando Trp es L-Trp entonces Leu es D-Leu o viceversa; mientras que el segmento de peptidilo hidrófilo comprende una secuencia de aminoácidos de $(\text{Lys})_r$, en la que r es un número entero de 1 a 15. Además, el grupo amino del extremo N y todos los restos de Lys del primer péptido anfílico están acetilados; mientras que al menos el grupo amino del extremo N o uno de los restos de Lys del segundo péptido anfílico no están acetilados. En algunas realizaciones, ninguno de los grupo amino del extremo N ni los restos de Lys del segundo péptido anfílico están acetilados.

20 En algunas realizaciones, la partícula de péptidos mixta puede comprender una pluralidad (por ejemplo, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o más) de los primeros péptidos anfílicos y una pluralidad (por ejemplo, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o más) de los segundos péptidos anfílicos.

25 En realizaciones particulares, el primer péptido o péptidos anfílicos y el segundo péptido o péptidos anfílicos pueden seleccionarse entre una cualquiera o más realizaciones de un péptido anfílico descrito anteriormente en la sección "péptidos anfílicos de ejemplo". En algunas realizaciones, el primer y el segundo péptido anfílico pueden comprender cada uno independientemente una secuencia de aminoácidos de $(\text{L-Lys})-(\text{L-Lys})-(\text{L-Lys})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-\text{X}$, en el que X está ausente o es NH_2 .

30 La relación del primer péptido anfílico al segundo péptido anfílico puede variarse basándose en una serie de factores, por ejemplo, pero no limitados a, la solubilidad y/o estabilidad de la partícula de péptidos deseable y/o las propiedades del principio activo que se va a cargar en la misma. En algunas realizaciones, la relación del primer péptido anfílico al segundo péptido anfílico puede estar en un intervalo de aproximadamente 1:1000 a aproximadamente 1000:1. En algunas realizaciones, la relación del primer péptido anfílico al segundo péptido anfílico puede estar en un intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1000:1. En algunas realizaciones,
35 la relación del primer péptido anfílico al segundo péptido anfílico puede estar en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 500:1. En algunas realizaciones, la relación del primer péptido anfílico al segundo péptido anfílico puede estar en un intervalo de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 200:1. En otras realizaciones, la relación del primer péptido anfílico al segundo péptido anfílico puede estar en un intervalo de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 100:1.

40 En algunas realizaciones, la partícula de péptidos mixta puede comprender además un principio activo que se describe en el presente documento. El principio activo puede estar presente en la partícula de péptidos mezclado en cualquier cantidad, por ejemplo, dependiendo de la capacidad de carga de la partícula de péptidos y/o de la capacidad de unión del primer o el segundo péptido anfílico. En algunas realizaciones, la relación del principio activo a los segundos péptidos anfílicos puede estar en un intervalo de aproximadamente 1:1000 a 1:1. En algunas realizaciones, la relación del principio activo a los segundos péptidos anfílicos puede ser o aproximadamente 1:100 a aproximadamente 1:10. En algunas realizaciones, la relación del principio activo al segundo péptido anfílico puede estar en un intervalo de aproximadamente 1:50 a aproximadamente 1:5. En algunas realizaciones, la relación del principio activo al segundo péptido anfílico puede estar en un intervalo de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:2.
50

55 En algunas realizaciones, la partícula de péptidos mixta puede comprender, además, en su superficie exterior un ligando que se describe en el presente documento. Como se ha descrito anteriormente, la selección de un ligando puede determinarse basándose en una molécula diana (por ejemplo, pero no limitada a, células, bacterias, proteínas, ácidos nucleicos) a la que se une la partícula de péptidos mixta. Los ejemplos no limitantes de un ligando pueden incluir un ligando de receptor de superficie celular o una proteína tal como un anticuerpo. En algunas realizaciones, el ligando puede estar unido covalentemente a al menos uno del primer y el segundo péptido anfílico, por ejemplo, el segmento de peptidilo hidrófilo de al menos uno del primer y el segundo péptido anfílico.

60 La partícula de péptidos mixta que se describe en el presente documento puede utilizarse para encapsular cualquier principio activo que se describe en el presente documento. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la presencia del segundo péptido anfílico en la partícula de péptidos mixta puede proporcionar una carga catiónica para la unión con moléculas de ácido nucleico aniónicas. Por tanto, en algunas realizaciones, el principio activo puede incluir una molécula de ácido nucleico.

65

Un aspecto adicional proporcionado en el presente documento se refiere al uso de una o más realizaciones de la partícula de péptidos mixta que comprende un primer péptido anfifílico y un segundo péptido anfifílico que se describen en el presente documento para la entrega de una molécula de ácido nucleico a una célula. En consecuencia, en algunas realizaciones, la partícula de péptidos mixta para su uso en la entrega de una molécula de ácido nucleico a una célula comprende un primer péptido anfifílico, un segundo péptido anfifílico y una molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la partícula de péptidos mixta puede comprender una pluralidad (por ejemplo, al menos 2 o más) de moléculas de ácido nucleico u oligonucleótidos (por ejemplo, ADN o ARN, incluyendo, pero no limitados a, ARNip, ARNhc, ARNmi o cualquier combinación de los mismos). En algunas realizaciones, las moléculas de ácidos nucleicos o los oligonucleótidos pueden diseñarse para su uso en la intervención terapéutica, por ejemplo, la terapia génica o la terapia con ARNip.

Ensamblaje de partículas de péptidos

Las partículas de péptidos que se describen en el presente documento pueden ensamblarse mediante un procedimiento en una sola etapa. Por ejemplo, las partículas de péptidos pueden ensamblarse oportunamente a partir de péptido anfifílico disuelto por adición de agua: una emulsión formada espontáneamente como una mezcla ternaria (péptido, disolvente orgánico, H₂O) se lleva a la región de dos fases (péptido, H₂O). Mientras que el proceso de emulsión se asemeja al efecto ouzo, las gotas de péptidos anfifílicos se endurecen a partículas sólidas a medida que se elimina el disolvente orgánico. Moléculas neutras así como cargadas migran eficientemente en la fase dispersa y quedan atrapadas durante la formación de las partículas.

En general, las partículas de péptidos que comprenden un principio activo y un ligando pueden ensamblarse en aproximadamente 15 minutos usando el procedimiento que se describe en el presente documento. Además, el sistema permite el ajuste sencillo del tamaño de partícula y atrapa principios activos en muy alta densidad.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la simplicidad del sistema y el protocolo de formación se originan en la interacción concertada de todos los componentes implicados de una partícula de péptidos: los péptidos anfifílicos no solo son material de la matriz, sino que reemplazan rutinas de encapsulación debido a su alta afinidad por otros componentes tales como un ligando y/o un principio activo. El proceso de encapsulación del principio activo se asemeja muy probablemente a una extracción líquida de dos fases en la que el principio activo se escapa de la fase acuosa y se acumula en gotitas de péptidos. Adicionalmente, la solubilidad del péptido en disolventes orgánicos suaves permite la disolución y el auto-ensamblaje simultáneos de todos los componentes implicados. La presencia de un ligando durante la emulsión de los péptidos puede dar como resultado la formación de una corona de ligandos. Adicionalmente, la presencia del ligando puede permitir el ajuste sencillo del tamaño de partícula debido a su tensioactividad y, por tanto, la estabilización temprana de la emulsión de péptidos.

Composiciones farmacéuticas

Para la administración a un sujeto, pueden proporcionarse partículas de péptidos y principio activo - complejos de péptidos anfifílicos que se describen en el presente documento en composiciones farmacéuticamente aceptables. Estas composiciones farmacéuticamente aceptables comprenden una partícula o un principio activo - complejo de péptido anfifílico formulados junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables (aditivos) y/o diluyentes. Como se describe en detalle a continuación, las composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento pueden formularse especialmente para la administración en forma sólida o líquida, incluyendo las adaptadas para lo siguiente: (1) administración oral, por ejemplo, pociones (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), sondas, pastillas para chupar, grageas, cápsulas, píldoras, comprimidos (por ejemplo, los que tienen por objeto la administración bucal, sublingual y la absorción sistémica), bolos, polvos, gránulos, pastas para su aplicación a la lengua; (2) administración parenteral, por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural en forma de, por ejemplo, una solución o suspensión estéril o una formulación de liberación sostenida; (3) aplicación tópica, por ejemplo, en forma de una crema, pomada o un parche de liberación controlada o pulverización aplicada a la piel; (4) por vía intravaginal o intrarrectal, por ejemplo, en forma de un pesario, crema o espuma; (5) por vía sublingual; (6) por vía ocular; (7) por vía transdérmica; (8) por vía transmucosa; o (9) por vía nasal. Adicionalmente, los compuestos pueden implantarse o inyectarse en un paciente mediante un sistema de entrega de fármacos. Véase, por ejemplo, Urquhart, et al., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24: 199-236 (1984); Lewis, ed. *"Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals"* (Plenum Press, Nueva York, 1981); Patente de los EE.UU. N.º 3.773.919; y Patente de los Estados Unidos. N.º 35 3.270; 960.

Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del criterio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acordes con una relación beneficio/riesgo razonable.

Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, coadyuvante (por ejemplo, lubricante, talco, magnesio, calcio o estearato de cinc o ácido estérico) o material de encapsulación disolvente, involucrados en llevar o transportar el compuesto objeto desde un órgano o parte del

cuerpo, a otro órgano o parte del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina y acetato de celulosa; (4) goma tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, lauril sulfato de sodio y talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol (PEG); (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua apirógena; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tamponantes del pH; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; (22) agentes formadores de volumen, tales como polipéptidos y aminoácidos (23) componente de suero, tal como albúmina sérica, HDL y LDL; (22) alcoholes C₂-C₁₂, tales como etanol; y (23) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas. También pueden estar presentes en la formulación agentes humectantes, agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes perfumantes, conservantes y antioxidantes. Los términos tales como "excipiente", "vehículo", "vehículo farmacéuticamente aceptable" o similares se usan indistintamente en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "administrar" se refiere a la colocación de una composición en un sujeto mediante un método o vía que da como resultado al menos la localización parcial de la composición en un sitio deseado de manera que se produzca el efecto deseado. Las vías de administración incluyen tanto la administración local como la sistémica. En general, la administración local da como resultado la entrega de más cantidad del agente terapéutico en una ubicación específica en comparación con el cuerpo entero del sujeto, mientras que la administración sistémica da como resultado la entrega del agente terapéutico a esencialmente todo el cuerpo del sujeto.

La administración a un sujeto puede ser por cualquier vía apropiada conocida en la técnica incluyendo, pero no limitada a, las vías oral o parenteral, incluyendo la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, vías respiratorias (aerosol), pulmonar, nasal, rectal y tópica (incluyendo la administración bucal y sublingual).

Los modos de administración de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, inyección, infusión, instilación, inhalación o ingestión. "Inyección" incluye, sin limitación, la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, sub capsular, subaracnoidea, intraespinal, intracerebroespinal e intraesternal. En algunas realizaciones de los aspectos que se describen en el presente documento, la administración es mediante infusión intravenosa o inyección.

Como se usa en el presente documento, un "sujeto" se refiere a un ser humano o animal. Por lo general, el animal es un vertebrado tal como un primate, roedor, animal doméstico o animal de caza. Los primates incluyen chimpancés, macaco de Java, monos araña y macacos, por ejemplo, macaco de la India. Los roedores incluyen ratones, ratas, marmotas, hurones, conejos y hámsteres. Los animales domésticos y de caza incluyen vacas, caballos, cerdos, ciervos, bisontes, búfalos, felinos, por ejemplo, gato doméstico, especies caninas, por ejemplo, perros, zorros, lobos, especies de aves, por ejemplo, pollo, emú, avestruz y peces, por ejemplo, trucha, siluros y salmón. El paciente o sujeto incluye cualquier subconjunto de los anteriores, por ejemplo, todos los anteriores, pero excluyendo uno o más grupos o especies tales como los seres humanos, primates y roedores. En ciertas realizaciones de los aspectos que se describen en el presente documento, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un primate, por ejemplo, un ser humano. Los términos, "paciente" y "sujeto" se usan indistintamente en el presente documento. Los términos, "paciente" y "sujeto" se usan indistintamente en el presente documento. Un sujeto puede ser hombre o mujer.

Preferentemente, el sujeto es un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano, primate no humano, ratón, rata, perro, gato, caballo o vaca, pero no se limitan a estos ejemplos. Pueden utilizarse ventajosamente mamíferos distintos de seres humanos como sujetos que representan modelos animales de trastornos asociados a la enfermedad autoinmune o inflamación. Además, los métodos y composiciones que se describen en el presente documento pueden usarse para tratar a los animales y/o mascotas domesticados.

Kits

Un aspecto adicional proporcionado en el presente documento se refiere a un kit que comprende una partícula de péptidos, una formulación que comprende una partícula de péptidos o componentes para la fabricación de una partícula de péptidos o una formulación que comprende una partícula de péptidos que se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, las composiciones o kits para la fabricación de una o más realizaciones de una partícula de péptidos o una partícula de péptidos mixta se proporcionan en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición o kit puede comprender un péptido anfifílico que se describe en el presente documento. El péptido anfifílico suministrado en la composición o kit puede proporcionarse en un recipiente. Dependiendo de la elección de un usuario de una partícula de péptidos o partícula mixta descritas en el presente documento para que se produzca, en algunas realizaciones, la composición o kit puede comprender un primer péptido anfifílico y un segundo péptido anfifílico que se describe en el presente documento. El péptido anfifílico puede proporcionarse en polvo o polvo liofilizado. En algunas realizaciones, la composición o kit puede comprender además al menos un reactivo, por ejemplo, para la reconstitución del péptido anfifílico en polvo, para la emulsión de una mezcla de un conjunto de partículas o ambos. En algunas realizaciones, la composición o kit puede comprender adicionalmente un ligando que se describe en el presente documento, por ejemplo, proporcionado en un contenedor separado. En algunas realizaciones, la composición o kit puede comprender adicionalmente un principio activo para encapsular en la partícula de péptidos. El principio activo puede proporcionarse en un recipiente separado.

Además de los componentes anteriormente mencionados, el kit puede incluir material informativo. El material informativo puede ser descriptivo, de instrucción, de marketing u otro material que se relaciona con los métodos que se describen en el presente documento y/o el uso de los agregados de los métodos que se describen en el presente documento. Por ejemplo, el material informativo describe los métodos para la administración de la partícula a un sujeto. El kit también puede incluir un dispositivo de administración.

En una realización, el material informativo puede incluir instrucciones para administrar la formulación de una manera adecuada, por ejemplo, en una dosis, forma de dosificación o modo de administración (por ejemplo, una dosis, forma de dosificación o modo de administración que se describen en el presente documento) adecuados. En otra realización, el material informativo puede incluir instrucciones para identificar un sujeto adecuado, por ejemplo, un ser humano, por ejemplo, un ser humano adulto. El material informativo de los kits no está limitado en su forma. En muchos casos, el material informativo, por ejemplo, instrucciones, se proporciona en materia impresa, por ejemplo, un texto, dibujo y/o fotografía impresos, por ejemplo, una etiqueta u hoja impresa. Sin embargo, el material informativo también puede proporcionarse en otros formatos, tales como Braille, material de lectura informática, grabación de vídeo o grabación de audio. En otra realización, el material informativo del kit es un enlace o información de contacto, por ejemplo, una dirección física, dirección de correo electrónico, hipervínculo, sitio web o número de teléfono, donde un usuario del kit puede obtener información sustancial acerca de la formulación y/o su uso en los métodos que se describen en el presente documento. Por supuesto, el material informativo también puede proporcionarse en cualquier combinación de formatos.

En algunas realizaciones los componentes individuales de la formulación pueden proporcionarse en un recipiente. Como alternativa, puede ser deseable proporcionar los componentes de la formulación por separado en dos o más recipientes, por ejemplo, un recipiente para una preparación de péptidos anfifílico y al menos otro para un compuesto vehículo. Los diferentes componentes pueden combinarse, por ejemplo, de acuerdo con las instrucciones proporcionadas con el kit. Los componentes pueden combinarse de acuerdo con un método que se describe en el presente documento, por ejemplo, para preparar y administrar una composición farmacéutica.

Además de la formulación, la composición del kit puede incluir otros ingredientes, tales como un disolvente o tampón, un estabilizante o un conservante y/o un segundo agente para tratar una afección o trastorno que se describe en el presente documento. Como alternativa, los otros ingredientes pueden incluirse en el kit, pero en diferentes composiciones o contenedores que la formulación. En dichas realizaciones, el kit puede incluir instrucciones para mezclar la formulación y los otros ingredientes o para el uso del oligonucleótido junto con los otros ingredientes.

La formulación puede proporcionarse en cualquier forma, por ejemplo, en forma líquida, seca o liofilizada. Se prefiere que la formulación sea sustancialmente pura y/o estéril. Cuando se proporciona la formulación en una solución líquida, la solución líquida preferentemente es una solución acuosa, prefiriéndose una solución acuosa estéril. Cuando la formulación se proporciona como una forma seca, la reconstitución generalmente es mediante la adición de un disolvente adecuado. El disolvente, por ejemplo, agua estéril o tampón, puede proporcionarse opcionalmente en el kit.

En algunas realizaciones, el kit contiene recipientes separados, separadores o compartimentos para la formulación y el material informativo. Por ejemplo, la formulación puede estar contenida en un frasco, vial o jeringuilla y el material informativo puede estar contenido en una funda o paquete de plástico. En otras realizaciones, los elementos separados del kit están contenidos dentro de un único contenedor, sin dividir. Por ejemplo, la formulación está contenida en un frasco, vial o jeringa a los que se ha unido el material informativo en forma de una etiqueta.

En algunas realizaciones, el kit incluye una pluralidad, por ejemplo, un envase, de recipientes individuales, conteniendo cada uno una o más formas de dosificación unitarias de la formulación. Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de jeringuillas, ampollas, paquetes de aluminio o envases blíster, conteniendo cada uno una dosis unitaria individual de la formulación. Los recipientes de los kits pueden ser herméticos y/o impermeables.

Las realizaciones de los diversos aspectos que se describen en el presente documento pueden ilustrarse mediante los siguientes párrafos numerados.

- 5 1. Una partícula de péptidos que comprende un péptido anfifílico, comprendiendo el péptido anfifílico un segmento de peptidilo hidrófobo y un segmento de peptidilo hidrófilo, en la que el segmento de peptidilo hidrófobo comprende una secuencia de aminoácidos de $(\text{Trp-Leu})_m-(\text{Trp})_n$ o $(\text{Leu-Trp})_p-(\text{Leu})_q$, en la que cada Trp es D-Trp o L-Trp y cada Leu es D-Leu o L-Leu, m y p son independientemente un número entero de 1 a 5 y n y q son independientemente 0 o 1, a condición de que cuando Trp es D-Trp entonces Leu es L-Leu y cuando Trp es L-Trp entonces Leu es D-Leu o viceversa; y
- 10 en la que el segmento de peptidilo hidrófilo comprende una secuencia de aminoácidos de $(\text{Lys})_r$, en la que r es un número entero de 1 a 15, y en la que la partícula de péptidos comprende adicionalmente en su superficie exterior un ligando.
2. La partícula de péptidos del párrafo 1, en la que r es un número entero de 2 a 5.
3. La partícula de péptidos del párrafo 1 o 2, en la que r es un número entero de 3.
- 15 4. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-3, en la que al menos un resto Lys del segmento de peptidilo hidrófilo o el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico están acetilados.
5. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-4, en la que todos los restos de Lys del segmento de peptidilo hidrófilo están acetilados.
6. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-5, en la que el grupo amino del extremo N del péptido
- 20 anfifílico está acetilado.
7. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-6, en la que el segmento de peptidilo hidrófobo está unido al extremo C del segmento de peptidilo hidrófilo.
8. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-7, en la que Leu es D-Leu.
9. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-8, en la que Trp es L-Trp.
- 25 10. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-9, en la que Lys es L-Lys.
11. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-10, en la que m o p es entre 1 y 3.
12. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-11, en la que m o p es 3.
13. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-12, en la que n o q es 1.
- 30 14. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-13, en la que el péptido anfifílico comprende la secuencia de aminoácidos de $(\text{L-Lys})-(\text{L-Lys})-(\text{L-Lys})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Tip})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-\text{X}$, en la que X está ausente o es NH_2 .
15. La partícula de péptidos del párrafo 14, en la que al menos uno de los restos de L-Lys está acetilado.
16. La partícula de péptidos del párrafo 14 o 15, en la que el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico está acetilado.
- 35 17. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-16, en la que el péptido anfifílico tiene una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 restos de aminoácidos.
18. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-17, en la que al menos una cadena principal de amida del péptido anfifílico es un enlace de reemplazo de amida.
19. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-18, en la que el péptido anfifílico comprende un β -
- 40 aminoácido, un γ -aminoácido o una combinación de los mismos.
20. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-19, en la que al menos uno del segmento de peptidilo hidrófobo o el segmento de peptidilo hidrófilo comprende al menos una mutación puntual.
21. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-20, en la que el ligando incluye un ligando de receptor de superficie celular o un anticuerpo.
- 45 22. La partícula de péptidos del párrafo 21, en la que el ligando de receptor de superficie celular incluye transferrina, EGF, ácido fólico o cualquier combinación de los mismos.
23. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-22, en la que el espesor del ligando presente en la superficie exterior de la partícula de péptidos varía de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm.
24. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 23, en la que el espesor del ligando presente en la
- 50 superficie exterior de la partícula de péptidos es de aproximadamente 10 nm.
25. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-24, en la que el ligando está unido covalentemente al péptido anfifílico.
26. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-25, en la que el ligando está unido covalentemente al segmento de peptidilo hidrófilo del péptido anfifílico.
- 55 27. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-26, en la que una relación del ligando al péptido anfifílico varía de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:1000000.
28. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-27, en la que la partícula tiene un tamaño de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 5000 nm.
29. La partícula de péptidos del párrafo 28, en la que la partícula tiene un tamaño de aproximadamente 30 nm a
- 60 aproximadamente 150 nm.
30. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-29, en la que la partícula de péptidos comprende una mezcla de un péptido anfifílico completamente acetilado de cualquiera de los párrafos 1-29 y un péptido anfifílico parcialmente acetilado de cualquiera de los párrafos 1-29.
31. La partícula de péptidos del párrafo 30, en la que la relación del péptido anfifílico totalmente acetilado al
- 65 parcialmente acetilado varía de aproximadamente 95:5 a aproximadamente 1:1.
32. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 30-31, en la que la partícula de péptidos comprende

adicionalmente un péptido anfifílico no acetilado.

33. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 1-32, que comprende adicionalmente un principio activo.

34. La partícula de péptidos del párrafo 33, en la que el principio activo se dispersa dentro de la partícula.

35. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 33-34, en la que el principio activo no tiene carga neta.

36. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 33-34, en la que el principio activo tiene una carga neta.

37. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 33-36, en la que el principio activo se selecciona entre el grupo que consiste en proteínas, péptidos, antígenos, anticuerpos o porciones de los mismos, moléculas similares a anticuerpos, enzimas, ácidos nucleicos, aptámeros, moléculas pequeñas, antibióticos, agentes farmacéuticamente activos, agentes terapéuticos, agentes de contraste y cualquier combinación de los mismos.

38. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 33-37, en la que el principio activo es un agente farmacéuticamente activo o un agente terapéutico.

39. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 33-38, en la que el principio activo es una molécula de ácido nucleico.

40. La partícula de péptidos del párrafo 39, en la que la molécula de ácido nucleico incluye ARNip, ARNmi, ARNhc o cualquier combinación de los mismos.

41. La partícula de péptidos del párrafo 39, en la que la molécula de ácido nucleico es ADN.

42. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 33-41, en la que una relación del principio activo al péptido anfifílico varía de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:10.000.

43. La partícula de péptidos del párrafo 42, en la que la relación del principio activo al péptido anfifílico varía de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:100 o de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:10.

44. Uso de la partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 33-43 para la administración dirigida de un principio activo.

45. Uso del párrafo 44, en el que el principio activo es impermeable a las células cuando se entrega a una célula por sí solo.

46. Uso de una composición que comprende un péptido anfifílico cargado positivamente como agente de penetración en las células o agente de transfección, en el que el péptido anfifílico cargado positivamente comprende un segmento de peptidilo hidrófobo y un segmento de peptidilo hidrófilo,

en el que el segmento de peptidilo hidrófobo comprende una secuencia de aminoácidos de $(\text{Trp-Leu})_m-(\text{Trp})_n$ o $(\text{Leu-Trp})_p-(\text{Leu})_q$, en las que cada Trp es D-Trp o L-Trp y cada Leu es D-Leu o L-Leu, m y p son independientemente un número entero de 1 a 5 y n y q son independientemente 0 o 1, a condición de que cuando Trp es D-Trp entonces Leu es L-Leu y cuando Trp es L-Trp entonces Leu es D-Leu o viceversa;

en el que el segmento de peptidilo hidrófilo comprende una secuencia de aminoácidos de $(\text{Lys})_r$, en la que r es un número entero de 1 a 15; y

en el que al menos uno de los restos de Lys o el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico no están acetilados.

47. El uso del párrafo 46, en el que todos los restos de Lys y el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico no están acetilados.

48. El uso del párrafo 46 o 47, en el que r es un número entero de 2 a 5.

49. El uso de cualquiera de los párrafos 46-48, en el que r es un número entero 3.

50. El uso de cualquiera de los párrafos 46-49, en el que el segmento de peptidilo hidrófobo está unido al extremo C del segmento de peptidilo hidrófilo.

51. El uso de cualquiera de los párrafos 46-50, en el que Leu es D-Leu.

52. El uso de cualquiera de los párrafos 46-51, en el que Trp es L-Trp.

53. El uso de cualquiera de los párrafos 46-52, en el que Lys es L-Lys.

54. El uso de cualquiera de los párrafos 46-53, en el que m o p está entre 1 y 3.

55. El uso de cualquiera de los párrafos 46-54, en el que m o p es 3.

56. El uso de cualquiera de los párrafos 46-55, en el que n o q es 1.

57. El uso de cualquiera de los párrafos 46-56, en el que el péptido anfifílico tiene una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 restos de aminoácidos.

58. El uso de cualquiera de los párrafos 46-57, en el que al menos un enlace de amida de la cadena principal del péptido anfifílico es un enlace de reemplazo de amida.

59. El uso de cualquiera de los párrafos 46-58, en el que el péptido anfifílico comprende un β -aminoácido, un γ -aminoácido o una combinación de los mismos.

60. El uso de cualquiera de los párrafos 46-59, en el que al menos uno del segmento de peptidilo hidrófobo o el segmento de peptidilo hidrófilo comprende al menos una mutación puntual.

61. El uso de cualquiera de los párrafos 46-60, en el que la partícula tiene un tamaño de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 5.000 nm.

62. El uso del párrafo 61, en el que la partícula tiene un tamaño de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 150 nm.

63. El uso de cualquiera de los párrafos 46-62, en el que el péptido anfifílico comprende la secuencia de aminoácidos de $(\text{L-Lys})-(\text{L-Lys})-(\text{L-Lys})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-\text{X}$, en la que X está ausente o es NH_2 .

64. El uso de cualquiera de los párrafos 46-63, en el que la composición comprende adicionalmente una molécula de ácido nucleico que se entrega en una célula.

65. Una partícula de péptidos que comprende un primer péptido anfifílico y un segundo péptido anfifílico, comprendiendo el primer y el segundo péptido anfifílico cada uno independientemente un segmento de peptidilo hidrófobo y un segmento de peptidilo hidrófilo, en la que el segmento de peptidilo hidrófobo comprende una secuencia de aminoácidos de $(\text{Trp-Leu})_m-(\text{Trp})_n$ o $(\text{Leu-Trp})_p-(\text{Leu})_q$, en la que cada Trp es D-Trp o L-Trp y cada Leu es D-Leu o L-Leu, m y p son independientemente un número entero de 1 a 5 y n y q son independientemente 0 o 1, a condición de que cuando Trp es D-Trp entonces Leu es L-Leu, y cuando Trp es L-Trp entonces Leu es D-Leu o viceversa; y en la que el segmento de peptidilo hidrófilo comprende una secuencia de aminoácidos de $(\text{Lys})_r$, en la que r es un número entero de 1 a 15, y
- 10 en la que el grupo amino del extremo N y todos los restos de Lys del primer péptido anfifílico están acetilados; y en la que al menos el grupo amino del extremo N o uno de los restos de Lys del segundo péptido anfifílico no están acetilados.
66. La partícula de péptidos del párrafo 65, en la que ninguno del grupo amino del extremo N y los restos de Lys del segundo péptido anfifílico están acetilados.
- 15 67. La partícula de péptidos del párrafo 65 o 66, que comprende adicionalmente un principio activo.
68. La partícula de péptidos del párrafo 67, en la que el principio activo incluye una molécula de ácido nucleico.
69. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-68, en la que la relación del principio activo al segundo péptido anfifílico está en un intervalo de aproximadamente 1:1000 a 1:1 o de aproximadamente 1:100 a aproximadamente 1:10.
- 20 70. La partícula de péptidos del párrafo 69, en la que la relación del principio activo al segundo péptido anfifílico está en un intervalo de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:2.
71. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-70, en la que la relación del primer péptido anfifílico al segundo péptido anfifílico está en un intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1000:1 o de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 100:1.
- 25 72. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-71, que comprende adicionalmente en su superficie exterior un ligando.
73. La partícula de péptidos del párrafo 72, en la que el ligando incluye un ligando de receptor de superficie celular o un anticuerpo.
- 30 74. La partícula de péptidos del párrafo 73, en la que el ligando de receptor de superficie celular incluye transferrina, EGF, ácido fólico o cualquier combinación de los mismos.
75. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-74, en la que el espesor del ligando presente en la superficie exterior de la partícula de péptidos varía de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm.
76. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 75, en la que el espesor del ligando presente en la superficie exterior de la partícula de péptidos es de aproximadamente 10 nm.
- 35 77. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-76, en la que el ligando está unido covalentemente a al menos uno del primer y el segundo péptido anfifílico.
78. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-77, en la que el ligando está unido covalentemente al segmento de peptidilo hidrófilo de al menos uno del primero y el segundo péptido anfifílico.
79. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-78, en la que una relación del ligando al péptido anfifílico varía de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:1000000.
- 40 80. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-79, en la que r es un número entero de 2 a 5.
81. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-80, en la que r es un entero de 3.
82. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-81, en la que el segmento de peptidilo hidrófobo está unido al extremo C del segmento de peptidilo hidrófilo.
- 45 83. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-82, en la que es Leu D-Leu.
84. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-83, en la que Trp es L-Trp.
85. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-84, en la que Lys es L-Lys.
86. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-85, en la que m o p es entre 1 y 3.
- 50 87. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-86, en la que m o p es 3.
88. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-87, en la que n o q es 1.
89. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-88, en la que el primer y el segundo péptido anfifílico tienen cada uno independientemente una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 restos de aminoácidos.
90. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-89, en la que al menos un enlace de amida de la cadena principal del primer o del segundo péptido anfifílico es un enlace de reemplazo de amida.
- 55 91. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-90, en la que al menos uno del primer y del segundo péptido anfifílico comprende un β -aminoácido, un γ -aminoácido o una combinación de los mismos.
92. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-91, en la que al menos uno del segmento de peptidilo hidrófobo o el segmento de peptidilo hidrófilo comprende al menos una mutación puntual.
- 60 93. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-92, en la que la partícula de péptidos tiene un tamaño de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 5.000 nm.
94. La partícula de péptidos del párrafo 93, en la que la partícula de péptidos tiene un tamaño de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 150 nm.
95. La partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-94, en la que el primer y el segundo péptido anfifílico comprenden cada uno independientemente la secuencia de aminoácidos de $(\text{L-Lys})-(\text{L-Lys})-(\text{L-Lys})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-\text{X}$, en la que X está ausente o es NH_2 .
- 65

96. Uso de la partícula de péptidos de cualquiera de los párrafos 65-95 para la entrega de una molécula de ácido nucleico a una célula.

97. El uso del párrafo 96, en el que la molécula de ácido nucleico incluye ARNip, ARNmi, ARNhc o cualquier combinación de los mismos.

98. El uso del párrafo 96, en el que la molécula de ácido nucleico incluye ADN.

99. Un péptido anfifílico que comprende un segmento de peptidilo hidrófobo y un segmento de peptidilo hidrófilo, en el que el segmento de peptidilo hidrófobo comprende una secuencia de 2 a 10 aminoácidos D y L alternos seleccionados entre alanina, valina, isoleucina, leucina (Leu), fenilalanina, tirosina o triptófano (Trp) y

en el que el segmento de peptidilo hidrófilo comprende aminoácidos cargados o no cargados pero polares o derivados de los mismos.

100. El péptido anfifílico del párrafo 99, en el que el segmento de peptidilo hidrófobo comprende una secuencia de aminoácidos de $(\text{Trp-Leu})_m-(\text{Trp})_n$ o $(\text{Leu-Trp})_p-(\text{Leu})_q$, en la que cada Trp es D-Trp o L-Trp y cada Leu es D-Leu o L-Leu, m y p son independientemente un número entero de 1 a 20 y n y q son independientemente 0 o 1, a condición de que cuando Trp es D-Trp entonces Leu es L-Leu y cuando Trp es L-Trp entonces Leu es D-Leu o viceversa.

101. El péptido anfifílico del párrafo 99 o 100, en el que el segmento de peptidilo hidrófilo comprende al menos una carga presente ya sea en el extremo N o en un resto de aminoácido.

102. El péptido anfifílico del párrafo 101, en el que la al menos una carga es ya sea una carga catiónica o una carga aniónica.

103. El péptido anfifílico del párrafo 99 o 100, en el que el segmento de peptidilo hidrófilo comprende aminoácidos no cargados pero polares.

104. El péptido anfifílico de cualquiera de los párrafos 99 a 103, en el que el segmento de peptidilo hidrófilo comprende al menos una carga y al menos un aminoácido no cargado pero polar.

105. El péptido anfifílico de cualquiera de los párrafos 99 a 104, en el que al segmento de peptidilo hidrófobo está unido covalentemente un polímero.

106. El péptido anfifílico de cualquiera de los párrafos 99-105, en el que al menos un grupo amino en el péptido anfifílico está acetilado.

107. El péptido anfifílico del párrafo 102, en el que la al menos una carga catiónica está en un resto de aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Lys, Arg, His y cualquier combinación de los mismos.

108. El péptido anfifílico del párrafo 102, en el que la al menos una carga aniónica está en un resto de aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Asp o Glu y cualquier combinación de los mismos.

109. El péptido anfifílico del párrafo 103, en el que al menos un resto de aminoácido no cargado pero polar se selecciona entre el grupo que consiste en Ser, Thr, Asn o Gln y cualquier combinación de los mismos.

110. El péptido anfifílico del párrafo 105, en el que el polímero se selecciona entre el grupo que consiste en PEG, PGG, PEO, policaprolactona, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polihidroxialcaboatos, dextranos, polianhidridos, PLA-PGA, polioctoéster, polifumarato, hidrogeles, cualquier polímero biocompatible y/o biodegradable reconocido en la técnica y cualquier combinación de los mismos.

111. El péptido anfifílico de cualquiera de los párrafos 99 a 110, en el que el segmento de peptidilo hidrófilo comprende una secuencia de aminoácidos de $(\text{Lys})_r$, en la que r es un número entero de 1 a 15.

112. El péptido anfifílico del párrafo 111, donde r es 3.

113. El péptido anfifílico de cualquiera de los párrafos 99-112, en el que el al menos un grupo amino es un grupo amino del extremo N del péptido anfifílico.

114. El péptido anfifílico de cualquiera de los párrafos 99-113, en el que el al menos un grupo amino está en un resto de Lys del segmento de peptidilo hidrófilo.

115. El péptido anfifílico de cualquiera de los párrafos 99-114, en el que todos los grupos amino en el segmento de peptidilo hidrófilo están acetilados.

116. El péptido anfifílico de cualquiera de los párrafos 99-115, en el que el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico y al menos uno de los grupos amino en el segmento de peptidilo hidrófilo están acetilados.

117. El péptido anfifílico de cualquiera de los párrafos 99-116, en el que el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico y todos los grupos amino en el segmento de peptidilo hidrófilo están acetilados.

118. El péptido anfifílico de cualquiera de los párrafos 99-117 en el que el segmento de peptidilo hidrófobo está unido al extremo C del segmento de peptidilo hidrófilo.

119. El péptido anfifílico de cualquiera de los párrafos 99-118, en el que Leu es D-Leu.

120. El péptido anfifílico de cualquiera de los párrafos 99-119, en el que Trp es L-Trp.

121. El péptido anfifílico de cualquiera de los párrafos 99-120, en el que Lys es L-Lys.

122. El péptido anfifílico de cualquiera de los párrafos 99-121, en el que m o p está entre 1 y 3.

123. El péptido anfifílico del párrafo 122, en el que m o p es 3.

124. El péptido anfifílico de cualquiera de los párrafos 99-123, en el que n o q es 1.

125. El péptido anfifílico de cualquiera de los párrafos 99-124, en el que el péptido anfifílico comprende la secuencia de aminoácidos de $(\text{L-Lys})-(\text{L-Lys})-(\text{L-Lys})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})$, en la que al menos uno de los restos de L-Lys está acetilado.

126. El péptido anfifílico de cualquiera de los párrafos 99-125, en el que el péptido anfifílico comprende la secuencia de aminoácidos de $\text{Ac}-(\text{L-Lys})-(\text{L-Lys})-(\text{L-Lys})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})$.

127. El péptido anfifílico del párrafo 126, en el que al menos uno de los restos de L-Lys está acetilado.

128. El péptido anfifílico de cualquiera de los párrafos 99-127, en el que el péptido anfifílico comprende la secuencia de aminoácidos de $\text{Ac}-(\text{L-Lys}(\text{Ac}))-(\text{L-Lys}(\text{Ac}))-(\text{L-Lys}(\text{Ac}))-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})$.

Leu)-(L-Trp)-X, en el que X está ausente o es NH₂.

129. El péptido anfifílico de cualquiera de los párrafos 99-128, en el que el péptido anfifílico tiene una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 restos de aminoácidos.

130. El péptido anfifílico de cualquiera de los párrafos 99-129, en el que al menos un enlace amida de la cadena principal es un enlace de reemplazo de amida.

131. El péptido anfifílico de cualquiera de los párrafos 99-130, en el que el péptido anfifílico comprende al menos un β-aminoácido, γ-aminoácido o cualquier combinación de los mismos.

132. El péptido anfifílico de cualquiera de los párrafos 99-131, en el que al menos uno del segmento de peptidilo hidrófobo o el segmento de peptidilo hidrófilo comprende al menos una mutación puntual.

133. Una partícula que comprende uno o más péptidos anfifílicos de cualquiera de los párrafos 99-132.

134. La partícula del párrafo 133, que comprende adicionalmente un ligando.

135. La partícula del párrafo 133 o 134, en la que el ligando es un ligando de receptor de superficie celular o un anticuerpo.

136. La partícula del párrafo 135, en la que el ligando de receptor de superficie celular es transferrina o EGF o folato.

137. Las partículas de cualquiera de los párrafos 133-136, en las que el ligando está presente sobre una superficie exterior de la partícula.

138. La partícula de cualquiera de los párrafos 133-137, en la que el ligando se adsorbe en la superficie exterior de la partícula.

139. La partícula del párrafo 137 o 138, en la que un espesor del ligando presente en la superficie exterior de la partícula varía de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm.

140. La partícula del párrafo 139, en la que el espesor del ligando presente en la superficie exterior de la partícula es de aproximadamente 10 nm.

141. La partícula de cualquiera de los párrafos 133-140, en la que el ligando está unido covalentemente al péptido anfifílico.

142. La partícula de cualquiera de los párrafos 133-141, en la que el ligando está unido covalentemente al segmento de peptidilo hidrófilo del péptido anfifílico.

143. La partícula de cualquiera de los párrafos 133-142, que comprende adicionalmente un principio activo.

144. La partícula del párrafo 143, en la que el principio activo se dispersa dentro de la partícula.

145. La partícula de cualquiera de los párrafos 143-144, en la que el principio activo no tiene carga neta.

146. La partícula de cualquiera de los párrafos 143-144, en la que el principio activo tiene una carga neta.

147. La partícula de cualquiera de los párrafos 143-146, en la que el principio activo comprende al menos un grupo aromático.

148. La partícula de cualquiera de los párrafos 143-147, en la que el principio activo se selecciona entre el grupo que consiste en proteínas, péptidos, antígenos, anticuerpos o porciones de los mismos, moléculas similares a anticuerpos, enzimas, ácidos nucleicos, aptámeros, moléculas pequeñas, antibióticos, agentes farmacéuticamente activos, agentes terapéuticos, agentes de contraste y cualquier combinación de los mismos.

149. La partícula de cualquiera de los párrafos 143-148, en la que el principio activo es un agente farmacéuticamente activo.

150. La partícula de cualquiera de los párrafos 143-149, en la que el principio activo es una molécula de ácido nucleico.

151. La partícula del párrafo 150, en la que la molécula de ácido nucleico es ARNip, miARN o ARNhc.

152. La partícula del párrafo 150, en la que la molécula de ácido nucleico es ADN.

153. La partícula de cualquiera de los párrafos 143-152, en la que una relación del principio activo a los péptidos anfifílicos varía de 1:1 a 1:100.000.

154. La partícula del párrafo 153, en la que la relación del principio activo a los péptidos anfifílicos varía de 1:1 a aproximadamente 1:1000.

155. La partícula de cualquiera de los párrafos 134-154, en la que una relación del ligando a los péptidos anfifílicos varía de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:1000000.

156. La partícula de cualquiera de los párrafos 133-155, en la que la partícula tiene un tamaño de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 5000 nm.

157. La partícula del párrafo 156, en la que la partícula tiene un tamaño de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 150 nm.

158. La partícula de cualquiera de los párrafos 133-157, en la que la partícula comprende una mezcla de péptidos anfifílicos totalmente acetilados y parcialmente acetilados de cualquiera de los párrafos 99-132.

159. La partícula del párrafo 158, en la que la relación de los péptidos anfifílicos totalmente acetilado a los parcialmente acetilados varía de aproximadamente 95:5 a aproximadamente 1:1.

160. La partícula de cualquiera de los párrafos 133-159, en la que la partícula comprende adicionalmente péptidos anfifílicos no acetilados.

161. Un método de uso de un compuesto péptido anfifílico como sistema de entrega.

162. El método del párrafo 161, en el que el sistema de entrega es un sistema de entrega dirigida.

163. El método del párrafo 161 o 162, en el que el sistema de entrega es con fines terapéuticos o de diagnóstico.

164. Uso de composiciones de péptidos como péptido de penetración celular o agente de transfección, respectivamente.

Algunas definiciones seleccionadas

A menos que se contrario o que quede implícito a partir del contexto, los siguientes términos y frases incluyen los significados que se indican a continuación. A menos que se indique expresamente lo contrario o que sea evidente a partir del contexto, los términos y frases a continuación no excluyen el sentido que el término o la frase han adquirido en la técnica a la que pertenece. Las definiciones se proporcionan para ayudar en la descripción de realizaciones particulares de los aspectos que se describen en el presente documento y no tienen por objeto a limitar la invención reivindicada, ya que el alcance de la invención está limitado solo por las reivindicaciones. Adicionalmente, a menos que se requiera otra cosa por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular.

Como se usa en el presente documento, la expresión "que comprende" o "comprende" se usa en referencia a composiciones, métodos y componente o componentes respectivos de los mismos, que son esenciales para la invención y que, sin embargo, están abiertos a la inclusión de elementos no especificados, ya sean esenciales o no. Adicionalmente, la expresión "que comprende" o "comprende" incluye "que consiste esencialmente en" y "que consiste en".

Como se usa en el presente documento, la expresión "que consiste esencialmente en" se refiere a los elementos necesarios para una realización determinada. La expresión permite la presencia de elementos adicionales que no afectan materialmente a la característica o características básicas y nuevas o funcionales de dicha realización de la invención.

El término "que consiste en" se refiere a composiciones, métodos y componentes respectivos de los mismos como se describen en el presente documento, que excluyen cualquier elemento no descrito en esa descripción de la realización.

Aparte de en los ejemplos operativos o donde se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción utilizadas en el presente documento deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente", cuando se usa en relación con los porcentajes puede significar $\pm$ el 1 %.

Los términos singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De forma similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento en la práctica o el ensayo de la presente divulgación, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. El término "comprende" significa "que incluye". La abreviatura "p. ej." deriva del Latín Exempli gratia y se utiliza en el presente documento para indicar un ejemplo no limitante. De este modo, la abreviatura "p. ej." es sinónimo de la expresión "por ejemplo".

La expresión "estadísticamente significativo" o "significativamente" se refiere a la significación estadística y generalmente significa una desviación típica de dos (2DT) por encima o por debajo de un nivel de referencia. El término se refiere a la evidencia estadística de que hay una diferencia. Se define como la probabilidad de tomar la decisión de rechazar la hipótesis nula cuando la hipótesis nula es realmente verdadera. La decisión se toma a menudo usando el valor p.

El término "nanoesferas" significa una partícula que tiene una relación de aspecto de como máximo 3:1. La expresión "relación de aspecto" se refiere a la relación entre el eje más largo de un objeto con respecto al eje más corto del objeto, donde los ejes no son necesariamente perpendiculares.

La expresión "dimensión más larga" de una partícula significa el camino directo más largo de la partícula. La expresión "camino directo" significa el camino más corto contenido dentro de la partícula entre dos puntos en la superficie de la partícula. Por ejemplo, una partícula helicoidal tendría una dimensión más larga correspondiente a la longitud de la hélice si se estirase en una línea recta.

El término "nanobastón" significa una partícula que tiene una dimensión más larga de como máximo 200 nm y que tiene una relación de aspecto de 3:1 a 20:1.

El término "nanoprisma" significa una partícula que tiene al menos dos caras no paralelas conectadas por un borde común.

La "longitud" de una partícula significa la dimensión más larga de la partícula.

La "anchura" de una partícula significa la media de las anchuras de la partícula; y el "diámetro" de una partícula es el promedio de los diámetros de la partícula.

La dimensión "promedio" de una pluralidad de partículas significa el promedio de esa dimensión para la pluralidad. Por ejemplo, el "diámetro promedio" de una pluralidad de nanoesferas significa el promedio de los diámetros de las nanoesferas, donde un diámetro de una sola nanoesfera es el promedio de los diámetros de esa nanoesfera.

- 5 Como se usa en el presente documento, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario de un compuesto, por ejemplo, de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Estas sales pueden prepararse *in situ* en el vehículo de administración o en el proceso de fabricación de las formas de dosificación o haciendo reaccionar por separado un compuesto purificado en su forma de base libre o de ácido con un ácido o una base orgánicos o inorgánicos adecuados y aislando la sal formada de este modo durante la posterior purificación. Las sales no tóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como ácido sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, palmítico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isotiónico y similares. Véase, por ejemplo, Berge et al., "*Pharmaceutical Salts*", *J. Pharm. Sci.* 66:1-19 (1977).

En algunas realizaciones de los aspectos que se describen en el presente documento, las sales representativas incluyen las sales de bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, succinato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato y laurilsulfonato y similares.

Como se usa en el presente documento, una relación puede ser una relación en moles o una relación en peso o una relación molar.

- 25 Como se usa en el presente documento, un "péptido de penetración celular" o "péptido que penetra la célula" se define como un péptido que tiene permeabilidad de membrana y es capaz de atravesar membranas biológicas o una barrera fisiológica. Los péptidos que penetran las células (CPP, del inglés *cell penetrating peptides*) también se denominan péptidos permeables a las células, dominios de transducción de proteínas (PTD, del inglés *protein transduction domains*) o secuencias de translocación de membrana (MTS, del inglés *membrane-translocation sequences*). Los CPP tienen la capacidad de translocarse *in vitro* y/o *in vivo* a través de las membranas celulares de mamíferos y entrar en las células y dirigir un compuesto conjugado de interés, tal como un fármaco o un marcador, a un destino celular deseado, por ejemplo en el citoplasma (citósol, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, etc.) o en el núcleo. En consecuencia, el CPP puede dirigir o facilitar la penetración de un compuesto de interés a través de una membrana fosfolipídica, mitocondrial, endosómica o nuclear. El CPP también puede dirigir un compuesto de interés desde fuera de la célula a través de la membrana plasmática y dentro del citoplasma o a una ubicación deseada dentro de la célula, por ejemplo, el núcleo, los ribosomas, las mitocondrias, el retículo endoplasmático, un lisosoma o un peroxisoma. Como alternativa o además, el CPP puede dirigir un compuesto de interés a través de las barreras hematoencefálica, transmucosa, hematorretiniana, cutánea, gastrointestinal y/o pulmonar.

- 40 La penetración a través de una membrana biológica o una barrera fisiológica puede determinarse mediante diversos procesos, por ejemplo mediante un ensayo de penetración celular que tiene una primera etapa de incubación para el CPP conjugado con un marcador en presencia de células de cultivo, seguida de una etapa de fijación y después la revelación de la presencia del péptido marcado dentro de la célula. En otra realización, la etapa de revelación puede hacerse con una incubación del CPP en presencia de anticuerpos marcados y dirigidos contra el CPP, seguido de la detección en el citoplasma o en la proximidad inmediata del núcleo de la célula o incluso dentro de ella, de la reacción inmunológica entre la secuencia de aminoácidos del CPP y los anticuerpos marcados. La revelación también puede hacerse mediante el marcado de una secuencia de aminoácidos en el CPP y la detección de la presencia del marcaje en los compartimentos celulares. Los ensayos de penetración celular son bien conocidos por los expertos en la materia. Sin embargo, por ejemplo se describe un ensayo de penetración celular en la solicitud de patente mencionada anteriormente N.º WO 97/02840.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente de transfección" o "reactivo de transfección" se refiere a un compuesto que se une o se compleja con un compuesto y mejora su entrada en las células. En general, la expresión agente de transfección se utiliza para compuestos que potencian la entrega de ácidos nucleicos en una célula.

En la medida en que no se ha indicado, se entenderá por los expertos ordinarios en la técnica que una cualquiera de las diversas realizaciones descritas e ilustradas en el presente documento pueden modificarse adicionalmente para incorporar características mostradas en cualquiera de las otras realizaciones que se desvelan en el presente documento.

Los siguientes ejemplos ilustran algunas realizaciones y aspectos de la invención. Los siguientes ejemplos no limitan en modo alguno la invención.

Ejemplos

Materiales y métodos de ejemplo (para los Ejemplos 1-2)

5 **Materiales de ejemplo:** Todos los productos químicos y reactivos incluyendo la rosa de bengala (RB) (Aldrich 330000, 95 %) y la 5-carboxi-fluoresceína (CF) (Sigma-Aldrich C0537, 99 %) se obtuvieron de Sigma-Aldrich y se utilizaron sin purificación adicional a menos que se indique lo contrario a continuación. Se adquirieron aminoácidos protegidos con Fmoc y reactivos de acoplamiento de IRIS Biotech y Novabiochem. Se adquirieron placas de cristalización de 24 pocillos de Hampton Research (Plate Cryschem).

10 **Síntesis de péptidos:** Todos los péptidos se sintetizaron en fase sólida utilizando la química del grupo de protección Fmoc. Las etapas individuales de la síntesis se enumeran en la Tabla 1. Se utilizó resina Rink Amide AM (200 mg, carga: 0,4 mmol/g-0,8 mmol/g) como fase sólida en una jeringuilla de 10 ml. Todas las reacciones se realizaron en dimetilformamida (DMF) previamente tratada con óxido de aluminio para reducir la abundancia de aminas libres. Los
15 Fmoc-aminoácidos se disolvieron en DMF (0,5 M) antes de la síntesis. Los grupos de protección Fmoc se partieron dos veces para cada etapa de acoplamiento utilizando piperidina en DMF (40 %). Se utilizó (1-),3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilén]-5-cloro-,hexafluorofosfato de 1H-benzotriazolío (HCTU) como un agente de acoplamiento y se disolvió N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) en 1-metil-2-pirrolidinona (NMP) como base. Todos los acoplamientos se ejecutaron con 4 equivalentes (eq) de aminoácido, HCTU (4 eq) y DIPEA (12 eq) en relación con la capacidad de
20 carga de la resina. Después de cada etapa de acoplamiento, el grupo amino terminal sin reaccionar se protegió por acetilación con una solución de anhídrido acético (5 eq) y DIPEA en DMF (5 eq).

Tabla 1: Etapas automatizadas de la síntesis de péptidos en fase sólida del lote de Fmoc

[Etap]	Disolvente/reactivo	Repetición	Tiempo (min)	Descripción
1	Piperidina al 40 %/DMF	1	5	desprotección de Fmoc
2	Piperidina al 40 %/DMF	1	10	desprotección de Fmoc
3	DMF	5	1	Lavado
4	Aminoácido protegido con 4 eq de Fmoc, 4 eq de HCTU, 12 eq de DIPEA	1	60	Acoplamiento ^(a)
5	DMF	2	1	Lavado
6	5 eq de anhídrido acético, 5 eq de DIPEA	1	20	Protección terminal ^(b)
7	DMF	3	1	Lavado

^(a)En DMF Alox/NMP; ^(b) En DMF Alox; en la que DMF Alox es DMF previamente tratada con óxido de aluminio

25 Se aplicó el mismo protocolo en una síntesis aumentada a escala utilizando resina Rink Amide AM (5 g) donde la reacción se realizó en un reactor de vidrio de 500 ml en fase sólida usando 3 eq de aminoácidos y reactivos de acoplamiento. El pH se mantuvo constante a 9 a lo largo de la reacción y la resina se probó para determinar grupos amino libres usando un ensayo de Kaiser y trinitrobenzenosulfonato (TNBS) después de cada etapa de
30 acoplamiento y escisión. No hubo necesidad de usar NMP como cosolvente.

Los rendimientos globales en general oscilan entre el 10 % y el 15 % una pureza del ~95 %, que es típica para la síntesis de péptidos en fase sólida.

Después de la síntesis, la resina de péptidos se lavó con DMF, alcohol isopropílico, DMF, diclorometano y éter dietílico antes de que se secase durante la noche en una línea de vacío. La escisión del péptido de la resina y la
35 eliminación de grupos de protección se realizó con TFA frío (95 %), trietilsilano (2,5 %) y H₂O (2,5 %). La mezcla de escisión enfriada con hielo se añadió a la resina y se incubó durante 2 h-3 h a temperatura ambiente. El cóctel de escisión filtrado se precipitó y se lavó con éter diisopropílico frío (40 ml). El sólido de color blanco se secó durante la noche en una línea de vacío.

40 **Purificación de péptidos:** Todos los péptidos se purificaron en una HPLC Shimadzu Prominence con los parámetros enumerados en la Tabla 2. Los péptidos en bruto se molieron y se disolvieron en una mezcla de DMF y acetonitrilo (4 ml, 1:1) y se diluyeron con H₂O (TFA al 0,1 %) hasta un volumen final de 20 ml. La gelificación del producto en bruto se elimina en estas condiciones de disolvente. La muestra posteriormente se filtró a través de un filtro de
45 jeringa PTFE de 0,45 µm y se bombeó en una columna de Merck LiChrospher 100, RP-18e (5 µm, 250-10) a un caudal de 4 ml/min y se eluyó con un gradiente lineal de agua (TFA al 0,1 %) a acetonitrilo (MeCN). A la elución de la muestra le siguió la absorción a 280 nm y se recogió de acuerdo con los volúmenes de fracción fija de 5 ml. La presencia del péptido producto se clasificó por espectrometría de masas (Figura 1A) y se cuantificó en desarrollos de HPLC analítica (Figura 1B). Las fracciones que contenían más del 80 % de producto (A₂₈₀) se aplicaron a una
50 segunda etapa de purificación en el mismo material de cromatografía realizada con ácido acético (2 %) en la fase acuosa. Las fracciones que contenían más del 95 % del producto se combinaron, se neutralizaron con amoníaco y se liofilizaron.

Tabla 2: Parámetros de la purificación por HPLC

Característica	Preparativa	Analítica
Disolvente A	H ₂ O bidestilada, TFA al 0,1 % o AcOH al H ₂ O bidestilada, TFA al 0,1 %	
Disolvente B	MeCN	MeCN
Columna	LiChrospher 100, RP-18e (5 µm), 250-10	LiChrospher 100, RP-18e (5 µm), 250-4,6
Gradiente	5 % de B → 95 % de B, 120 min	20 % de B → 70 % de B, 30 min
Inyectado	De acuerdo con las necesidades	25 µl
Volumen		
Caudal	5 ml/min	1,5 ml/min
Detección	A ₂₈₀	A ₂₈₀
Fraccionamiento	Λ > 500 mUA	-
Tamaño de la fracción	5 ml	-

Modificaciones posteriores a la purificación: La acetilación de aminas primarias en el extremo N y las lisinas se realizó en péptido purificado disuelto en DMF mediante la aplicación de un exceso de 40 veces de anhídrido acético y DIPEA. Se controló que la reacción se completara mediante espectrometría de masas antes de que la mezcla de reacción se volviera a purificar de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

Formación de perlas y co-ensamblaje: Se disolvieron CD3ac y Rosa de Bengala (RB) en H₂O:óxido de etileno en una relación de 1:1 y se mezclaron para producir concentraciones finales de RB 61,5 x 10⁻⁶ M, 184,5 x 10⁻⁶ M, 307,5 x 10⁻⁶ M, 615 x 10⁻⁶ M y 922,5 x 10⁻⁶ M. La concentración de CD3ac se mantuvo constante a 615 x 10⁻⁶ M. El intercambio de disolvente a H₂O se realizó mediante contraevaporación en placas de cristalización por gota posada de 24 pocillos; se aplicaron 50 µl de solución premezclada de CD3ac y RB a un pocillo de gota posada y de contraevaporaron cuatro veces contra 1 ml de H₂O durante 16 h. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Precipitaron esferas de CD3ac después de aproximadamente 30 min y el sedimento durante el próximo 5 h.

Con el fin de cuantificar la cantidad de RB encapsulada, el sedimento de perlas se resuspendió después del equilibrio de disolvente y se normalizó con H₂O a un volumen final de 100 µl. Posteriormente, todas las muestras se centrifugaron durante 30 min a 20 000 g, antes de que se separaran 80 ml de sobrenadante. La fracción del sedimento restante se diluyó 1:1 con 20 µl de DMSO para disolver los ensamblajes de péptidos. La concentración de RB en las fracciones de sedimento y sobrenadantes se determinó mediante mediciones de absorción y se corrigió para RB en los 20 µl restantes de la fracción de sedimento.

Estimación del volumen de las perlas y Coeficiente de Partición: Con el fin de estimar la densidad de los precipitados de CD3ac, se prepararon perlas (concentración de partida de CD3ac 307,5 x 10⁻⁶ M) lo suficientemente grandes como para exceder el límite de difracción de la luz visible. Una baja concentración de RB (10 x 10⁻⁶ M) se coprecipitó para permitir una estimación del diámetro de la perla por microscopía de fluorescencia confocal (1,35 µm) y facilitar el recuento en un hemocitómetro (Hausser Scientific). Se contaron un promedio de 72 perlas en un volumen de células observado de 250.000 µm³ que es igual a una fracción de volumen de perla de 3,71 x 10⁻⁴. Una solución de 50 µl de CD3ac 307,5 x 10⁻⁶ M por tanto contiene un volumen de perla total de 18,6 nl y la densidad de CD3ac puede determinarse ($\rho_{CD3ac} \sim 1,35 \text{ g/cm}^3$). El coeficiente de partición logarítmica de RB en una solución acuosa de perlas de CD3ac se calculó de acuerdo con

$$\log P_{CD3ac/H_2O} = \log\left(\frac{[RB]_{CD3ac}}{[RB]_{H_2O}}\right) \quad (1)$$

Espectroscopia de ultravioleta visible: Las mediciones de absorción se realizaron en un Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Se obtuvieron los coeficientes de extinción de CD3ac en H₂O:etanol:DMSO 1:1:2 (21.780 M⁻¹cm⁻¹, 280 nm) y Rosa de Bengala en H₂O:DMSO 1:1 (11.639 M⁻¹cm⁻¹, 562 nm). Se utilizó DMSO para disolver los precipitados CD3ac después del ensamblaje y para reducir la evaporación del disolvente durante el tiempo de preparación ya que las cantidades de volumen de muestra medidas eran de solo 4 µl. En caso necesario, la muestra se diluyó adicionalmente con H₂O:EtOH:DMSO 1:1:2 para producir intensidades de absorción en el intervalo lineal del instrumento. Las concentraciones de RB se determinaron mediante el peso antes del coensamblaje. Después de la coprecipitación de CD3ac y RB, las fracciones de sedimento y sobrenadante se diluyeron 1:1 con DMSO (CD3ac ensamblado se disuelve en una solución de H₂O:DMSO 1:1).

Dicroísmo circular (CD): Se realizaron experimentos de CD en un Applied Photophysics Chirascan en cubetas QS (1 mm de etapa). Se ajustaron concentraciones de la muestra para proporcionar valores de dínodo entre 300 V y 500 V en el intervalo de longitud de onda medido. Se realizaron medidas de blanco con agua inmediatamente antes de las mediciones de las muestras. Cada espectro se promedió a partir de tres barridos en intervalos de longitud de onda de 1 nm, cada una de dos preparaciones de muestras independientes. Todos los espectros se alisaron aplicando el algoritmo de segundo orden de Savitzky Golay. Los datos de CD se indican en unidades molares (deg cm² dmol⁻¹), que se muestran como grados de elipticidad molar.

Microscopía Electrónica de Barrido: Se realizó la microscopía electrónica de barrido (MEB) en un Hitachi S-4800. Los soportes de muestra de MEB se enfriaron a -196 °C antes de que una gota de la suspensión de perlas se aplicara directamente a la superficie del metal frío. La muestra congelada en el plato se liofilizó posteriormente, se sometió a bombardeo iónico con platino y se analizó.

Dispersión de luz dinámica: La dispersión de luz dinámica se midió en un sistema de goniómetro basado en la plataforma ALV/CGS-8F equipado con un correlador ALV/-5000/E y un láser de iones de argón con una longitud de onda de 633 nm (35 mW) en ángulos de dispersión entre 30 ° y 150 °. Un correlador ALV-5000/E calcula la función de autocorrelación de intensidad de fotones $g_2(t)$. Todos los experimentos se realizaron a $T = 293$ K y se evaluaron mediante un ajuste cumulante de segundo orden (teniendo en cuenta la forma esférica de las partículas previamente determinada mediante MEB). Se determinaron poldispersidades mediante el algoritmo de Contin en todos los ángulos y nunca excedieron de 0,11. Se realizaron mediciones dependientes del ángulo en etapas de 10 ° de 30 ° a 150 °. Con el fin de evitar la influencia de la dispersión múltiple, se realizaron experimentos dependientes de la concentración. Tanto para la dependencia angular como para la dependencia de la concentración, se calculó un radio hidrodinámico a partir de la fórmula de Stokes

$$r_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (2)$$

en la que r_h es el radio hidrodinámico de partículas esféricas, D es la constante de difusión, k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y η es la viscosidad del agua. Un gráfico de $1/r_h$ en función del ángulo (concentración) se representó gráficamente y el radio hidrodinámico (r_{h0}) se calculó mediante la extrapolación de las dos mediciones de la concentración y del ángulo a cero.

Espectrometría de masas: La espectrometría de masas se realizó en un LTQ-Orbitrap (Thermo Scientific). Se cargaron 5 µl de una solución de CD3ac (10×10^{-6} M, $H_2O:MeCN$ 2:1) en una columna capilar de 100 µm rellena previamente con Magic C18 AQ (diámetro de partícula de 3 µm). El péptido se eluyó en un gradiente de 30 min de H_2O (ácido fórmico al 4 %) a MeCN. El Orbitrap se ajustó en modo positivo y a una resolución de 10.000.

Microscopía confocal: se obtuvieron imágenes de microscopía confocal en un microscopio invertido motorizado Nikon Ti equipado con ópticas DIC, de fase y de epifluorescencia, un disco giratorio confocal Yokagawa CSU-10 con líneas de láser a 488 nm, 568 nm y 647 nm. Se usó una cámara CCD enfriada ORCA-AG Hamamatsu para la formación de imágenes confocal y se utilizó una Hamamatsu ORCA-R2 para la imagen de campo amplio. Se codisolvió CD3ac (615×10^{-6} M) con (a) RB (10×10^{-6} M), (b) CF (10×10^{-6} M) y (c) RB y CF (ambos 10×10^{-6} M) en un volumen de 50 µl de EtOH al 50 % cada uno y ser contraevaporaron contra el agua. La suspensión resultante se normalizó con H_2O hasta un volumen total de 50 µl por muestra y posteriormente se aplicó al microscopio confocal.

Ejemplo 1: Nanopartículas de péptido CD3ac sólido -caracterización estructural

Los péptidos hidrófobos convencionales son generalmente difíciles de sintetizar y purificar y también son generalmente difíciles de disolver y tienden a precipitar a estructuras amorfas en solución acuosa. De acuerdo con diversos aspectos y realizaciones que se describen en el presente documento, un péptido diseñado CD3ac de novo que consta de diez aminoácidos:



donde LK(Ac) = L-lisina acetilada; LW = L-triptófano; DL = D-leucina, demuestra propiedades diferentes de otros materiales peptídicos: CD3ac se disuelve fácilmente en la mayoría de los disolventes orgánicos (EtOH, iPrOH, DMSO, DMF, MeCN) y precipita en esferas en forma de perlas estructuradas de manera uniforme tras el intercambio de disolvente a agua (Figura 2A).

El péptido CD3ac (masa 1652,910 g/mol; pureza > 95 %, A280) puede considerarse anfifílico ya que su secuencia se divide en dos secciones: un bloque hidrófobo que consiste en L-triptófano y D-leucina alternos y uno hidrófilo que consiste en tres L-lisinas acetiladas. Los términos "hidrófilo" e "hidrófobo" como se usan en el presente documento no son absolutos sino que describen la polaridad relativa dentro de la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, de CD3ac. Aunque el péptido CD3ac es hidrófobo, puede sintetizarse con un alto rendimiento y se purifica con los procedimientos convencionales en material de cromatografía C18 de fase inversa (véase la sección de Materiales y Métodos descrita anteriormente), en comparación con péptidos hidrófobos convencionales.

CD3ac es capaz de precipitar en agregados esféricos en el intervalo del tamaño coloidal y puede hacerlo de una forma robusta y reproducible. El intercambio de disolvente se realizó mediante diálisis o, con el fin de reducir el consumo de material, por contraevaporación contra el agua en placas de cristalización de 24 pocillos. La distribución de tamaños de la suspensión de perlas de péptido resultante se midió por microscopía electrónica de barrido (MEB, Figuras 2A-2C) y dispersión dinámica de luz dependiente de la concentración y del ángulo (DLS, Figuras 3A-3B). Ambos métodos revelan un radio de partícula de aproximadamente 260 nm. El radio de la esfera puede estar

influenciado por la concentración de CD3ac inicialmente disuelta (antes del intercambio de disolvente) y se encuentra en el intervalo de tamaño entre aproximadamente 200 nm y aproximadamente 1500 nm que corresponde a las concentraciones iniciales CD3ac entre $61,5 \times 10^{-6}$ M a 923×10^{-6} M. Los datos de DLS mostrados en las Figuras 3A-3B se refieren a partículas de CD3ac formadas a partir de CD3ac inicialmente disuelto a 123×10^{-6} M.

- 5 Las partículas de péptidos (perlas) obtenidas tienen una baja polidispersidad sin necesidad de procedimientos de dimensionamiento tales como ultrasonidos o extrusión, que se aplican habitualmente para lograr una distribución de tamaños estrecha en, por ejemplo, suspensiones de lípidos.

La estructura secundaria puede desempeñar, en parte, un papel crucial en el ensamblaje de las perlas de CD3ac. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, debido a la dispersión de la luz, puede ser difícil obtener datos de dicroísmo circular cuantificables de suspensiones coloidales que contienen partículas de más de 50 nm de diámetro. Por tanto, se sintetizaron cuatro derivados estructurales de CD3ac (CD1, CD2, CD3 y CD4), que no están acetilados y por tanto están cargadas y son hidrosolubles (véase la Tabla 3).

- 15 *Tabla 3: Secuencias de aminoácidos y peso molecular de los péptidos de ejemplo sintetizados y derivados de los mismos*

[Nombre]	Secuencia	PM (Da)
CD1	H-LK-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH ₂	1228,680
CD2	H-LK-LK-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH ₂	1356,775
CD3	H-LK-LK-LK-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH ₂	1484,870
CD4	H-LK-LK-LK-LK-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH ₂	1612,965
CD3ac	Ac-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH ₂	1652,910
LCD3	H-LK-LK-LK-LW-LL-LW-LL-LW-LL-LW-NH ₂	1484,870
LCD3ac	Ac-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-LL-LW-LL-LW-LL-LW-NH ₂	1652,910

La figura 4 muestra espectros de dicroísmo circular de CD1 a CD4 en agua. Por lo general, los péptidos de poli-L-lisina cargados adoptan una estructura secundaria de enrollamiento al azar y presentan elipticidades negativas entre 180 nm y 210 nm; lo presentado en el presente documento demuestra que péptidos con secuencias de oligo-lisina más cortas muestran mayores elipticidades en este intervalo de longitudes de onda. Además, un espectro típico de enrollamiento al azar tiene poca o ninguna influencia sobre las elipticidades por encima de los 210 nm; Por tanto, el intervalo de longitud de onda entre 210 nm y 260 nm puede asignarse casi en su totalidad a la influencia de la secuencia alternante de L-Trp y D-Leu. Por ejemplo, la intensidad y la posición del pico a 223 nm se mantiene casi sin cambios a medida que el número de restos de lisina unidos se varía, lo que indica que la estructura secundaria de las unidades repetitivas de LW-DL se ve poco afectada o no se ve afectada en absoluto por la longitud de oligo-lisinas unidas N-terminalmente – posiblemente incluso no se vea afectada por la presencia de múltiples cargas catiónicas en los restos de lisina unidos.

Los espectros de dicroísmo circular de CD4-CD1 sirven para que puedan extrapolarse teóricamente a un CD0 imaginario, que no contendría ninguna lisina, para obtener un espectro con máximos a aproximadamente 196 nm y 223 nm. Espectros similares no se han observado en péptidos hidrófobos sintéticos anteriores, pero se han notificado previamente en estudios estructurales de gramicidina A, un péptido antibiótico de 15 aminoácidos derivado de la bacteria que vive en el suelo *Bacillus brevis* [16, 17].

El motivo de estructura secundaria de la gramicidina es una hélice amplia raramente observada en la naturaleza y versátil en términos de pendiente helicoidal, quiralidad y configuración dimérica (estructura cuaternaria) [17c, 18], dependientes de la constante dieléctrica de su medio ambiente [19]. Mientras la gramicidina A contiene un motivo de alternancia de L-Trp y D-Leu, el CD3ac presentado en el presente documento es distinto de la gramicidina en varios aspectos, por ejemplo, secuencia de péptidos y longitud, modificaciones significativas del formilo y la etanolamina unidos terminalmente presentes en la gramicidina. Por ejemplo, la secuencia de la gramicidina es hidrófoba en toda su longitud, pero el CD3ac presentado en el presente documento es anfifílico debido a la adición N-terminal de al menos una L-lisina (por ejemplo, 1 L-lisina, 2 L-lisinas o 3 L-lisinas) y la acetilación de al menos un grupo amino del péptido anfifílico.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, una secuencia repetitiva de LW-DL puede conducir a un conjunto de ángulos ϕ y ψ claramente diferentes de los observados en hélices alfa, laminas beta y enrollamientos al azar aislados, y muy probablemente estén gobernados por el impedimento estérico; pueden observarse ocasionalmente enlaces de hidrógeno intramoleculares estables en péptidos relativamente cortos [20]. Si bien este tipo de estructuras secundarias y enlaces de hidrógeno intramoleculares pueden existir en CD3ac, el CD3ac es muy probablemente demasiado corta para plegarse sobre sí mismo.

La importancia de la estructura secundaria en relación con el ensamblaje en forma de esferas se demostró mediante LCD3ac, un péptido de constitución idéntica (secuencia de aminoácidos), pero enteramente compuesto de L-aminoácidos. LCD3ac precipita a la estructura amorfa en el intervalo de tamaño de micrómetros (Figura 5A) y el

espectro de dicroísmo circular de LCD3 cargado tiene características α -helicoidales dominantes (Figura 5B). Los datos combinados de MEB y dicroísmo circular indican que la característica de la precipitación esférica depende, al menos en parte, de la presencia de D-Leu y la estructura secundaria específica inducida por la misma.

5 Ejemplo 2: Nanopartículas de péptido sólido CD3ac – Encapsulación de la carga

CD3ac es el primer péptido sintetizado por química Fmoc que forma partículas sólidas en el intervalo de tamaños nano y micrométricos y es una promesa para las aplicaciones de entrega de fármacos. Aunque las esferas CD3ac precipitadas, en algunas realizaciones, por lo general no se adhieren entre sí y no tienen afinidad observable por las superficies de vidrio o plástico, pueden encapsular moléculas de carga durante su formación. Se codisolvió CD3ac con 5-carboxifluoresceína (CF) 10×10^{-6} M, 4,5,6,7-tetracloro-2',4',5',7'-tetrayodofluoresceína (RB) 10×10^{-6} M y una mezcla equimolar de ambos colorantes, respectivamente. El experimento se realizó a pH 5, donde RB está cargada pero la CF está en gran medida protonada presentando baja solubilidad en solución acuosa. El volumen de disolvente se volvió a ajustar a 50 μ l después de la contra-evaporación, por lo que el contraste de fluorescencia entre el fondo y las perlas de péptido puede determinar al menos cualitativamente la acumulación de carga dentro de las esferas.

Tanto la CF como la RB son captadas por las perlas de CD3ac, más bien con independencia del estado de carga del colorante (Figuras 6A-6C). Sin embargo, las perlas cargadas con CF se agregan en ensamblajes con forma de uva, (Figura 6B), mientras que las esferas cargadas con RB no se adhieren entre sí (Figura 6A), muy probablemente debido a la visualización de RB cargada sobre o cerca de la superficie de la perla.

Tanto un colorante hidrófobo tal como CF como un colorante relativamente hidrófilo tal como RB pueden encapsularse en perlas de CD3ac. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, las moléculas hospedadoras pueden preasociarse a CD3ac en una fase temprana (en solución) y ensamblarse después de la retirada de etanol. El grado de preasociación y por tanto la eficiencia del coensamblaje, dependerá de la afinidad de los compuestos de hospedadores y de los huéspedes; en el caso de derivados xanteno tales como CF y RB, la interacción de estructuras de anillo deslocalizadas podría contribuir a su preasociación con CD3ac.

Para analizar la composición molar de las perlas de CD3ac cargadas, se cuantificó el contenido de colorante las perlas de CD3ac cargadas con RB. RB es fácilmente disponible y soluble en etanol así como en agua. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la solubilidad en agua es obligatoria para evitar la precipitación de carga fuera de las perlas de péptido en el intercambio de disolvente. Además, la absorción de luz de RB no se inactiva fuertemente en mezclas de agua y DMSO, lo que permite la cuantificación conveniente y precisa mediante densidad óptica.

En pocas palabras, CD3ac y RB se codisolviaron a diferentes relaciones de concentración en EtOH al 50 %. Se aplicaron 50 μ l de cada uno a placas de cristalización de 24 pocillos y se contraevaporaron cuatro veces contra 1 ml de H₂O durante 16 h. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Las esferas CD3ac generalmente precipitan después de aproximadamente 30 min, dependiendo de la concentración de RB. Después de equilibrar el disolvente, el sedimento de perlas formado se resuspendió y se normalizó con H₂O a un volumen final de 100 μ l. Las muestras se centrifugaron durante 30 min a 20.000 g, antes de que se separaron 80 μ l de sobrenadante. Posteriormente, la fracción de sedimento restante se diluyó 1:1 con 20 μ l de DMSO para disolver los ensamblajes de péptidos. Contrariamente al etanol, el uso de DMSO ayuda a reducir la evaporación de la muestra y produce valores de absorción estables durante al menos 5 min (el volumen de la muestra para un experimento de UV-Vis es de 4 μ l, véase la sección Materiales y Método de ejemplo que se ha descrito anteriormente).

Los datos de cuantificación de co-ensamblaje se resumen en la Figura 7A. La concentración de CD3ac se mantuvo constante a 615×10^{-6} M en los experimentos que se describen en el presente documento. La relación molar disuelta inicialmente de colorante a péptido se proporciona como $[RB]_i/[CD3ac]_i$. Por ejemplo, a $[RB]_i/[CD3ac]_i = 1$ como condición de partida experimental, después de la formación de perlas, aproximadamente un tercio de la composición molar de la esfera ($nRB_p/nCD3ac_p$) es RB (círculos abiertos como se muestra en la Figura. 7A) y aproximadamente el 25 % de colorante disuelto inicialmente se cargó en perlas de CD3ac (nRB_p/nRB_i , triángulos abiertos como se muestra en la Figura 7A). Como se muestra en la Figura 7B, la absorción de fracciones de sedimento y de sobrenadante a 280 nm (absorción máxima de triptófanos) indica que CD3ac precipita casi cuantitativamente en presencia de un amplio intervalo de concentraciones de RB (la relación molar de RB a CD3ac $[RB]_i/[CD3ac]_i$ en los experimentos que se describen en el presente documento abarca 1,5 órdenes de magnitud). La adición de concentraciones mayores de RB puede conducir a más moléculas de colorante coensambladas dentro de las perlas de CD3ac; sin embargo, la relación de RB inicialmente disuelta y coensamblada no es linealmente proporcional y la eficiencia del coensamblaje (nRB_p/nRB_i) alcanzará un límite de saturación.

La eficiencia de encapsulación de RB en perlas de CD3ac puede ascender hasta al menos aproximadamente el 30 % p/p o al menos aproximadamente el 40 % en moles o mayor en relaciones de concentración analizadas, lo que corresponde a un aumento de aproximadamente 900 veces la concentración de RB o un coeficiente de partición logarítmica de RB en CD3ac/H₂O de 2,95. Similares o incluso mayores eficiencias se contemplan para moléculas de carga hidrófoba; sin embargo, la cuantificación exacta de los compuestos insolubles en agua puede ser propensa a artefactos debido a la precipitación de carga fuera de las perlas de péptido en el **intercambio de disolvente**.

La capacidad de CD3ac de preasociarse de manera eficiente y coprecipitar RB es notable, al menos en parte debido a que RB está doblemente cargada y es hidrosoluble. De hecho, su solubilidad en agua es aproximadamente cinco veces mayor que en etanol. Como se presenta en el presente documento, el ensamblaje de perlas de CD3ac no se

inhibe por la presencia de concentraciones equimolares de RB y se contempla que, sin quedar ligado a teoría alguna, el péptido y el colorante interactúan principalmente sobre interacciones aromáticas que conducen a una unión más bien inespecífica (en comparación con, por ejemplo, avidina/biotina). Esta funcionalidad puede complementar las propiedades de encapsulación de nanopartículas lipídicas sólidas, así como sistemas vesiculares.

En el presente documento se presenta una secuencia altamente hidrófoba de 10 aminoácidos sintetizados y purificados con altos rendimientos y cantidades preparativas. El péptido (CD3ac) puede ensamblarse en perlas de forma uniforme, de baja polidispersidad de tamaño en ausencia de cualquier estrategia de moldes. Las mediciones de dicroísmo circular de derivados cargados de CD3ac indican una relación estructural con gramicidina D, L-helicoidal y el papel esencial de D-Leu con respecto a su estructura secundaria específica. LCD3, que contiene exclusivamente los aminoácidos L, presenta características α -helicoidales y precipita de forma amorfa en su estado acetilado. CD3ac puede encapsular ambos compuestos hidrófilos e hidrófobos con eficiencias superiores a las estrategias de encapsulación existentes [15], por ejemplo, dando como resultado coeficientes de reparto logarítmicos de al menos 2,95 y la eficiencia de encapsulación no está limitada por la concentración de las especies hidrófilas en solución, a menos que alcance un límite de saturación.

De acuerdo con diversos aspectos y realizaciones que se describen en el presente documento, el estado de las partículas de péptido sólidas junto con una encapsulación de carga altamente eficiente puede utilizarse para disminuir la degradación de productos farmacéuticos sensibles y caros y puede aplicarse para entregar altas cargas útiles en las células. Un sistema de entrega de fármaco de este tipo puede atrapar y acumular moléculas huéspedes (por ejemplo, principios activos) en un procedimiento práctico de una etapa. Por tanto, en el presente documento se presenta un sistema de entrega de fármacos no polimérico basado en componentes básicos de aminoácidos naturales y la síntesis mediante química Fmoc, que pueden aumentar la actual batería de herramientas de las especies coloidales y supone una promesa para aplicaciones médicas.

Ejemplo 3. Nanopartículas de CD3ac con una corona de proteínas para la entrega de fármacos a las células

Como se describe en los Ejemplos 1 y 2, las nanopartículas de péptidos CD3ac pueden ensamblarse a partir de CD3ac disuelto por adición de agua: se forma una emulsión espontáneamente según la mezcla ternaria (CD3ac, disolvente orgánico, H₂O) se lleva la región de dos fases (CD3ac, H₂O). El proceso de emulsión se asemeja al efecto ouzo (8), sin embargo, las gotitas de CD3ac se endurecen a partículas sólidas según se elimina el disolvente orgánico. Los ejemplos 1 y 2 demuestran que las moléculas aromáticas con carga neutra, así como las cargadas, pueden migrar a la fase dispersa y quedar atrapadas durante la formación de partículas (5).

En el Ejemplo 3, en el presente documento se presenta un nuevo sistema de entrega de fármacos que consiste en la matriz de péptido CD3ac, la carga atrapada (Flutax-2) y una corona de transferrina, opcionalmente marcada con Alexa Fluor 568 (Tfn-AF568) con fines de visualización. Para evaluar la disposición espacial de los reactivos en partículas de CD3ac autoensambladas, se disolvieron péptidos CD3ac junto con Flutax-2 y Tfn-AF568 en EtOH al 50 % y el contenido de EtOH se redujo en etapas como se muestra en los Materiales y Métodos de ejemplo más adelante. Las Figuras 8A-8I muestran imágenes de fluorescencia de las nanopartículas transportadoras de fármaco de péptido CD3ac resultantes. En esta realización, las nanopartículas CD3ac tenían aproximadamente 3 μ m de diámetro, el tamaño diseñado para ser lo suficientemente grande para distinguir la distribución de la fluorescencia entre el núcleo y la superficie por microscopía óptica convencional. Sin desear quedar ligado, pueden producirse nanopartículas de péptido CD3ac más pequeñas o más grandes. Tfn-AF568 muestra un anillo luminoso de fluorescencia en la periferia de la partícula mientras que la fluorescencia de Flutax-2 se distribuye por igual en toda la partícula (Figuras 8A-8C). La eficacia de captura se midió determinando el coeficiente de reparto de Flutax-2 entre las partículas de péptido y agua (Figuras 9A-9D). El coeficiente de partición de Flutax-2 entre las partículas de péptido y agua se determinó que era 5,25, es decir, en las condiciones experimentales aplicadas, más del 80 % del Flutax-2 codisuelto escapa a la fase acuosa y queda atrapado en las partículas. Dicho valor de coeficiente de reparto es notablemente alto para un compuesto hidrosoluble.

Las proteínas son generalmente tensioactivas y pueden adsorberse sobre las interfaces sólido-líquido. En consecuencia, se buscó determinar si las partículas en contacto con soluciones de proteínas pueden quedar cubiertas con una capa de proteínas que se denomina "corona de proteína" (10). Como tal, se evaluó si el borde pronunciado de la fluorescencia roja representa una corona que consiste en Tfn-AF568. Para evaluar esto, las partículas que se describen en el presente documento se incubaron durante 6 horas en 50 μ g/ml de tripsina. El borde desapareció, mientras que la distribución espacial de la carga de Flutax-2 permaneció inalterada (Figuras 8D-8F). La cuantificación de los perfiles de nivel de gris indica que la intensidad del borde de Tfn-AF568 se redujo 3 veces después de la incubación con tripsina (Figura 8G). Al mismo tiempo, la eliminación de la corona de Tfn-AF568 dio lugar a un aumento de la fluorescencia verde de Flutax-2 hasta un factor de 13 (Fig. 8H), originando la superposición espectral de Tfn-AF568-absorción y Flutax-2-emisión. Juntos, estos experimentos indican que el autoensamblaje de CD3ac, Flutax-2 y Tfn-AF568 conduce a la formación de partículas con Flutax-2 atrapado y una

corona de Tfn-AF568 adsorbido en la superficie. La tripsinización de las partículas autoensambladas pueden dar como resultado la degradación proteolítica de Tfn-AF568 seguida de desorción superficial de los fragmentos (Figura 8I).

- 5 Las partículas para la entrega de fármacos están generalmente entre 8 nm y 200 nm de diámetro ya que este intervalo de tamaño es menos probable que se elimine por el riñón y el hígado (4). Además, la endocitosis mediada por receptor, un posible mecanismo para la captación de partículas que contienen fármaco dirigidas, es dependiente del tamaño y es más eficiente para partículas más pequeñas de aproximadamente 150 nm (11). Con el fin de reducir el tamaño de partícula CD3ac, se disolvieron concentraciones de péptido más bajas antes de la emulsión: Las
- 10 Figuras 10A-10C muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de partículas de péptidos preparadas a partir de CD3ac 492 μ M, 246 μ M y 123 μ M, ensambladas en presencia de 10 μ g/ml de Tfn-AF568. Las diferencias de tamaño resultantes se resumen en la Figura 10D mediante perfiles de intensidad de fluorescencia asociada a partículas. El anillo característico, todavía visible a 492 nm, no puede observarse en partículas más pequeñas debido al límite de difracción de la luz visible, aunque la microscopía óptica confirma la presencia de Tfn-AF568 en
- 15 partículas menores de 300 nm (Figura 10E). Para confirmar la formación de corona de Tfn-AF568 sobre las nanopartículas ($d < 100$ nm), se aplicó microscopía electrónica de transmisión (MET).

- Brevemente, se utiliza PNP_{Carga}^{Corona} en el presente documento como un acrónimo para las nanopartículas de péptido CD3ac autoensambladas en presencia de carga (por ejemplo, Flutax-2 utilizado en el presente documento) y corona (por ejemplo, Tfn-AF568 utilizado en el presente documento). Las Figuras 10F-10I muestran imágenes de MET de
- 20 partículas PNP en diversas configuraciones: $PNP_{Flutax-2}$ (Figuras 10 F-10G) y $PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$ (Figuras 10H-10I). Ambas muestras se tiñeron con acetato de uranilo, apartando las partículas brillantes y el fondo oscuro. Se detectaron $PNP_{Flutax-2}$ en gran número y uniformemente distribuidas en la película de carbono (Figura 10F). Por el contrario, solo pudieron detectarse algunas partículas en la muestra de $PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$; en su lugar, se agruparon
- 25 (Figura 10H), lo que indica el proceso de deshumectación y la evaporación de agua residual durante la preparación de la muestra y, por tanto, la afinidad diferencial para el soporte de carbono hidrófobo. El aumento mayor (Figura 10I) muestra un borde de contraste intermedio en la interfaz de las nanopartículas. Su espesor medio de 9,85 nm (desviación típica = 2,1, $n = 99$) está de acuerdo con el diámetro de proteína esperado (12). Aunque ambas muestras se prepararon mediante el mismo protocolo, el diámetro medio de $PNP_{Flutax-2}$ (100 nm, Figura 10J) era dos
- 30 veces el de $PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$ (51 nm, sin incluir la corona, Figura 10K). Sin desear quedar ligado a teoría alguna, el tamaño medio de las partículas de péptido depende no solo en parte de la concentración de péptido, sino también en parte de la presencia de moléculas tensioactivas que estabilizan la emulsión en una fase temprana en el proceso de separación de fases (8). Por tanto, estos análisis de microscopía electrónica indican que los diámetros de
- 35 partículas de péptidos pueden controlarse hasta unos diez nanómetros, por ejemplo, mediante la modulación de diferentes parámetros de procesamiento, por ejemplo, pero no limitados a, la concentración de péptido y/o la concentración y/o los tipos de moléculas tensioactivas. Junto con las imágenes de microscopía de fluorescencia de las Figuras 8A-8F, las imágenes de MET indican la presencia de una corona de Tfn-AF568 en las PNP.

40 **Ejemplo 4. Entrega de Flutax-2 en células CHO mediante nanopartículas de CD3ac con una corona de proteína**

- La unión selectiva a receptores de transferrina (TfR) depende de la funcionalidad de la corona de proteína: su función puede verse comprometida por la desnaturalización de proteínas, el impedimento estérico (aglomeración) o la orientación desfavorable relativa a la superficie de las PNP. La acumulación de PNP en las superficies celulares
- 45 puede atribuirse a las interacciones específicas receptor-corona y/o a asociaciones no específicas. Por ejemplo, las fuerzas electrostáticas (Coulomb) y electrodinámicas (Van der Waals) pueden contribuir a la asociación inespecífica (13-15). Con el fin de ensayar la funcionalidad de la corona detectada en la mediación de la unión específica, el número de PNP asociadas a la superficie celular se relacionó con la densidad de TfR disponibles utilizando dos protocolos experimentales independientes: a) unión a PNP por Tfn en solución; y b) comparación de unión a PNP
- 50 entre las células de ovario de hámster chino (CHO) que expresan TfR y células TRVB, que derivan de tejido de ovario de hámster chino que carece de TfR endógena pero expresa TfR2 (16). Las Figuras 11A-11H muestran imágenes de microscopía de células CHO incubadas durante una hora con $PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$. Se detectó acumulación
- significativa de las PNP dentro del perímetro de células proyectada (Las Figuras 11A-C), que podría bloquearse por incubación de células CHO con Tfn 17 μ M sin marcar (Figuras 11D-11F). Esto indica que las interacciones de las
- 55 PNP con la superficie de la célula dependen del TfR libremente valente. La Figura 11G muestra que la menor densidad de TfR en TRVB conduce a una tasa de asociación significativamente reducida de $PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$. La incubación de TRVB con Tfn 17 μ M sin marcar bloquea la unión de $PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$ lo que indica que en estas células
- $PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$ interactúan mayoritariamente través del receptor de baja abundancia TfR2. La aplicación del exceso de Tfn no solo podría competir con las PNP por TfR sino que también puede intercambiar el Tfn-AF568 fluorescente
- 60 en la corona de partículas por Tfn no fluorescente. Para evaluar esta posibilidad, la distribución de intensidad de fluorescencia de $PNP_{Flutax-2}^{Tfn-AF568}$ incubada a 37 °C en presencia y ausencia de Tfn 17 μ M después de 24 horas se compararon y había diferencias insignificantes (Figuras 9C-9D). Esto indica que la tasa de unión mediada por TfR de

las PNP a la superficie celular es mucho más rápida que el intercambio de proteínas en la superficie de PNP. Junto con los resultados presentados en las Figuras 11A-11H, se demuestra que las PNP se unen a TfR específicamente a través de la corona de Tfn-AF568.

- 5 Mientras que $PNP^{Tfn-AF568}_{Flutax-2}$ puede unirse a las células a través de interacciones con TfR, Tfn podría dissociarse de la corona de PNP antes de que la internalización tenga lugar y/o la diferencia de tamaño entre proteínas Tfn individuales y una NP puede afectar a la captación celular. Por tanto, después se buscó determinar si las partículas pueden ser internalizadas por las células. La distinción entre las PNP asociadas e internalizadas no puede deberse directamente a la forma plana de las células de superficie adherente y a una resolución z limitada de la microscopía óptica. Como se ha mostrado anteriormente, la eliminación de Tfn-AF568 de la superficie de la partícula puede detectarse por un cambio pronunciado de verde a rojo en la relación de fluorescencia (V/R). Como tal, se midió la distribución de V/R para distinguir entre las PNP asociadas e internalizadas en las células, como se muestra en las Figuras 12A-12M, respectivamente. Las células CHO se fijaron y se tomaron imágenes después de 1 hora (Figs.12A-12E) y después de 6 horas (Figs.12G-12K) de incubación con $PNP^{Tfn-AF568}_{Flutax-2}$. Después de 1 hora, la
- 10 distribución de V/R mostró un pico estrecho aproximadamente a 1,5 para ambas PNP dentro (Figura 12E, barras negras) y fuera (Figura 12E, barras grises) del perímetro de la célula. Como se muestra en la Figura 12K, después de 6 horas, la población de PNP dentro del perímetro de las células (barras negras) muestra un cambio significativo hacia valores más altos de V/R, mientras que la distribución de V/R de las PNP fuera del perímetro de las células (barras grises) se mantuvo confinada en torno a 1,5. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se contempla que tras la incubación durante 1 hora, la mayoría de las PNP aún no han llegado a un compartimento lisosómico y las que se han internalizado todavía tienen una corona intacta que contiene Tfn-AF568; después de seis horas, la mayoría de las PNP habían sido transportadas en los lisosomas y sus coronas de proteínas se habían digerido proteolíticamente. Los productos de degradación más pequeños pueden dissociarse de la superficie de la partícula debido a las fuerzas más débiles de Van der Waals (17). En analogía a un aumento en V/R después de la eliminación de la corona por la tripsina (Figura 8H), la digestión proteolítica de la corona de PNP en los lisosomas puede producir un aumento en los valores de V/R de las PNP internalizadas. Esto se corrobora por los valores sin cambios de V/R de las PNP detectados en la superficie de vidrio. Los cambios en V/R pueden usarse en el presente documento como un indicador cualitativo de las PNP internalizadas (debido a la cinética de digestión relativamente lenta) para demostrar que las PNP con una corona de Tfn-AF568 pueden entrar o ser captadas por las células, por
- 15 ejemplo, por endocitosis mediada por clatrina a través de TfR (18).

- Para evaluar si la unión y la internalización de las PNP puede dar como resultado la importación selectiva de carga de molécula pequeña, se analizó la liberación de Flutax-2 encapsulado en las células 24 horas después de la adición de $PNP^{Tfn-AF568}_{Flutax-2}$ en las células (Figuras 13A-13I). El Flutax-2 es un derivado modificado con Verde de Oregón (OG)
- 20 de paclitaxel (19), un inhibidor mitótico aplicado en la terapia del cáncer (20). A diferencia de su forma no marcada, Flutax-2 se está cargado y es hidrosoluble a la concentración aplicada y, por consiguiente no penetra las membranas celulares. Por tanto, se utilizó un compuesto modelo para investigar la eficiencia y la especificidad de la entrega de moléculas pequeñas por las PNP al citosol. Se incubaron células CHO durante 24 horas con Flutax-2 0,67 μ M, ya sea disuelto en medios (Figuras 13A-13C) o atrapado en $PNP^{Tfn-AF568}_{Flutax-2}$ (Figuras 13D-13G). La emisión de Flutax-2 en el citosol se promedió para cuantificar la cantidad de compuesto entregado a las células. La permeación directa de Flutax-2 disuelto a través de las membranas celulares no se pudo detectar ya que la fluorescencia resultante no superó el nivel de autofluorescencia (Figuras 13B y 13I). Por otro lado, la incubación con $PNP^{Tfn-AF568}_{Flutax-2}$ dio como resultado una fuerte señal de fluorescencia verde difusa (Figuras 13E y 13G.), lo que indica la entrega de Flutax-2 al citosol. La entrega se redujo significativamente por la competencia de las interacciones PNP-célula con Tfn 17 μ M disuelto y sin marcar en medio de cultivo celular (Figura 13H). Asimismo, la tasa general de entrega fue significativamente menor para las células TRVb, que expresan solamente TfR2 (Figura 13H).
- 25

- En el presente documento se presenta un sistema de entrega dirigido de fármacos que consiste en una matriz de péptido CD3ac, Flutax-2 impermeable a las membranas celulares como carga y Tfn-AF568 como un ligando específico de receptores de la superficie celular, de acuerdo con una o más realizaciones que se describen en el presente documento. Los tres componentes pueden autoensamblarse para formar partículas cargadas con fármaco y funcionalizadas mediante la aplicación de un procedimiento de una sola etapa (por ejemplo, una sola etapa de aproximadamente 15 minutos). Sin desear quedar ligado, la simplicidad del sistema y el protocolo de formación se origina en la interacción concertada de todos los componentes implicados: CD3ac no solo es un material de la matriz, sino que reemplaza rutinas de encapsulación debido a su alta afinidad por moléculas aromáticas pequeñas. El proceso de captación de carga más probable se asemeja a una extracción de líquido de dos fases donde Flutax-2 escapa de la fase acuosa y se acumula en las gotitas de péptidos, probablemente debido a la alta afinidad entre sistemas de anillo deslocalizados de triptófanos y Flutax-2. Adicionalmente, la solubilidad del péptido en disolventes orgánicos suaves permite la disolución simultánea y el autoensamblaje de todos los componentes implicados. La presencia de Tfn-AF568 durante la emulsión de CD3ac da como resultado la formación de una corona de proteínas, que dirige PNP contra TfR. Adicionalmente, la presencia de la proteína en la superficie de las partículas puede permitir la modulación del tamaño de partícula debido a su actividad de superficie y por tanto estabilización en fase temprana de la emulsión de péptidos. Tras la internalización de las PNP en compartimentos lisosómicos, la digestión proteolítica en una escala de tiempo de unas pocas horas puede retirar la corona y a su vez liberar la carga atrapada
- 30

en el citosol en una escala de tiempo de días. La relación de fluorescencia de los colorantes verde encapsulado (por ejemplo, Flutax-2 utilizado en el presente documento) y rojo adherente a superficies (por ejemplo, Tfn-AF568) puede cambiar a un valor más alto (por ejemplo, por un factor de 13) al retirar la corona y este cambio puede permitir una descripción cualitativa de captación celular de partículas. La unión de PNP a Tfn y el intervalo de tamaño de las partículas indican captación de partículas, por ejemplo, a través de endocitosis mediada por clatrina. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la liberación de carga puede volver a la degradación proteolítica de las PNP en el lisosoma. Es probable la estructura de los productos de degradación de CD3ac cargado penetren las membranas lipídicas y puedan conducir a la rotura de los lisosomas (21).

10 **Materiales y métodos de ejemplo (para los Ejemplos 3-4)**

Soluciones madre: La síntesis y purificación de CD3ac se describió en "Materiales y Métodos de ejemplo para los Ejemplos 1-2" (Véase, por ejemplo, Dittrich y Meier (2010) *Macromolecular Bioscience* 10: 1406). Brevemente, el péptido se sintetizó sobre una fase sólida utilizando la química del grupo de protección Fmoc y se purificó en material de cromatografía C18 de fase inversa (RP) aplicando un gradiente de acetonitrilo y agua. La pureza se determinó por integración de los picos de los perfiles de elución de RP-HPLC a A²⁸⁰ y supera el 95 %. Se prepararon soluciones madre de CD3ac disolviendo el péptido en EtOH:H₂O (1:1 v/v). La concentración se determinó por absorción (Thermo Scientific Nanodrop 2000) a 280 nm en una mezcla de EtOH:H₂O:DMSO 1:1:2 teniendo en cuenta $\epsilon_{280} = 21780$. La concentración de péptido se ajustó a 742 μ M con EtOH:H₂O (1:1 v/v) y partes alícuotas de 200 μ l se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior. Se disolvió Tfn-AF568 (Invitrogen, T-23365) a una concentración de 500 μ g/ml y se almacenó a +4 °C. Se disolvió Flutax-2 (Invitrogen, P22310) a una concentración de 40 μ M en H₂O:EtOH (1:1) y se almacenó a -80 °C.

Ensamblaje de partículas, conducción y formación de corona: Las PNP se ensamblaron mediante la mezcla de soluciones madre de CD3ac, Tfn-AF568 y Flutax-2 para proporcionar concentraciones finales de CD3ac 123 μ M, Flutax-2 6 μ M y Tfn-AF568 10 μ g/ml en H₂O:EtOH (1:1, v/v). La emulsión se indujo mediante una primera etapa de dilución (1:1, H₂O) seguida de un período de equilibrio de 15 minutos antes de que el contenido de etanol se redujese adicionalmente al 25 % en la segunda etapa de dilución (1:1, H₂O). Se aplicaron alícuotas de 50 μ l de la suspensión resultante a placas de cristalización por gota posada de 24 pocillos (Hampton Research, Cryschem) y se contraevaporaron 3 veces contra 1 ml de H₂O durante seis horas.

Experimentos en células cultivadas: Se cultivaron estirpes celulares CHO en F12:DMEM 1:1 (Cellgro, 10-090) más suero bovino fetal al 10 % (Gibco). Se sembraron 2 x 10⁴ células en 0,5 ml de medio en cubreobjetos de vidrio (VWR, 89015-724) en placas de 24 pocillos (Falcon, 353047) y se incubaron durante 16 horas. Las células se lavaron una vez con PBS y se incubaron durante 30 minutos adicionales en medio F12 de Ham (Cellgro, 10-080) antes de que se aplicaran 50 μ l de solución de nanopartículas (NP) (como se preparó anteriormente) en 250 μ l de F12. La concentración de CD3ac utilizada en la incubación de células corresponde, por tanto, a 8,3 μ g/ml, ignorando el peso del Flutax-2 y el Tfn-AF568 asociados. En ensayos de competencia, las células se preincubaron durante 30 min en medio F12 que contenía Tfn 17 μ M (Sigma, T1283) antes de que se añadiera una solución de 50 μ l de PNP en 250 μ l de F12 que contenía Tfn 17 μ M. Las muestras se fijaron con paraformaldehído al 3 % (Sigma, P6148) en PBS, se montaron sobre portaobjetos de vidrio usando medio de montaje fluorescente (Dako, S3023) y se analizaron a las 24 horas.

Fluorimetría: Se realizaron experimentos de fluorescencia en un lector de placas BMG FLUOstar Omega en placas negras de 384 pocillos (MP100-1, Matrical). Se midieron series de dilución de Tfn-AF568 y Flutax-2 en H₂O:DMSO:FBS 6:3:1 (V:V:V) y los puntos de datos se ajustaron de forma lineal.

Tabla 4: Parámetros de ejemplo determinados a partir de la regresión lineal de datos

	Tfn-AF568		Flutax-2	
	Valor	Error típico	Valor	Error típico
Intercepción	4501,69	234,76	4809,00	85,56
Pendiente	1,011 x 10 ⁶	5750,49	5,573 x 10 ¹⁰	2,515 x 10 ⁸
R ²	0,99977		0,99986	

Para determinar las eficiencias de encapsulación de Flutax-2, las PNP se ensamblaron con el procedimiento descrito anteriormente en presencia de una concentración fija de Tfn-AF568 (10 μ g/ml) y diversas cantidades de Flutax-2 (1,6 μ M, 4 μ M, 8 μ M, 12,5 μ M y 16 μ M). Después del ensamblaje en placas de cristalización (véase anteriormente) las muestras de PNP se normalizaron con H₂O a 100 μ l y se centrifugaron durante 1 hora a 16.000 g antes de que se separaran 80 μ l de la fracción de sedimento. Ambas fracciones se normalizaron a 133,3 μ l en H₂O:DMSO:FBS 6:3:1 (v:v:v) antes de que se aplicaran 120 μ l a la placa de pocillos y se midiera la intensidad de fluorescencia.

Microscopía electrónica de transmisión: Se prepararon muestras de PNP como se ha descrito anteriormente. Se suspendieron 5 μ l de PNP en suspensión en H₂O a una red de cobre recubierta con película de carbón (malla cuadrada 400, Electron Microscopy Science) y se secaron. La muestra se tiñó con 10 μ l de acetato de uranilo 1 %

durante un minuto. El exceso de tinte se retiró con un papel de filtro y posteriormente se aplicó a un Tecnai G² Spirit BioTWIN.

Microscopía: Las células fijadas se analizaron en un microscopio invertido Nikon Ti equipado con una lente objetivo 60x Plan Apo NA 1.4. La fluorescencia de DAPI se excitó con un filtro 360/40 y se recogió con un filtro de emisión 460/50. La fluorescencia del verde Oregon se excitó con un filtro 360/40 y se recogió con un filtro de emisión 480/40. La fluorescencia de AF568 se excitó con un filtro 545/30 y se recogió con un filtro de emisión 620/60. Las imágenes se adquirieron con cámara CCD enfriada ORCA R2 Hamamatsu controlada con el software MetaMorph 7. La radiación gamma, el brillo y el contraste se ajustaron en las imágenes mostradas (de forma idéntica para los conjuntos de imágenes comparados) utilizando el software ImageJ. Se recogieron secciones ópticas de la serie z con un tamaño de etapa de 0,25 micrómetros que van del portaobjetos de vidrio a la PNP más alta detectable utilizando un motor de enfoque Prior Proscan II. Las muestras observadas después de 1 hora y 6 horas de incubación con PNP son proyecciones de apilamiento máximo (fusionadas) de canales de AF568 y Verde de Oregon (OG). Las muestras observadas después de 24 horas se obtuvieron por proyección promedio de fluorescencia de Verde de Oregon y proyección máxima de apilamientos de AF-568. La proyección promedio de OG se utilizó para cuantificar las diferencias de fluorescencia de Flutax-2 en el citosol. Los perímetros de las células se segmentaron manualmente en imágenes de DIC. Los puntos de máxima fluorescencia se extrajeron mediante ImageJ (v. 1.43u) utilizando una tolerancia de ruido de 50 en la clase pública MaximumFinder.

Ejemplo 5. Entrega de nocodazol en células HeLa con una o más realizaciones de nanopartículas de CD3ac

La Figura 16A muestra una realización de las nanopartículas de CD3ac, en la que EGF (opcionalmente marcado con rojo Texas con fines de visualización) es un ligando de dirección a células. Dichas nanopartículas de CD3ac con EGF como ligando pueden ser captadas por las células, como se muestra en la Figura 16B. Para producir perlas de CD3ac encapsuladas con nocodazol, en algunas realizaciones, se disolvieron CD3ac 21 µM, EGF 2 µg/ml (marcado con rojo Texas con fines de visualización) y nocodazol 20-40 µM en un disolvente orgánico (Figura 17A o 17G). El intercambio de disolvente con agua puede dar como resultado la formación de una emulsión y, por tanto, nanopartículas sólidas de CD3ac que contienen nocodazol y EGF. En algunas realizaciones, al menos una parte de EGF se encapsuló en perlas de CD3ac. Además, el EGF puede adsorberse en la superficie exterior de las perlas de CD3ac, dando como resultado perlas de CD3ac funcionalizadas con EGF.

Después de la incubación de las células HeLa en medios que contenían dichas partículas de CD3ac encapsuladas con dos concentraciones diferentes de nocodazol (20 µM o 40 µM), las imágenes microscópicas fluorescentes (Figura 17B-17F y 17H-17K) muestran que las partículas de CD3ac funcionalizadas con EGF fueron captadas por las células HeLa y los microtúbulos en esas células HeLa tratadas con partículas de CD3ac funcionalizadas con EGF estaban en gran parte despolimerizadas. Sin embargo, las células HeLa tratadas con el sobrenadante de suspensiones de CD3ac preincubadas y centrifugadas todavía contenían microtúbulos intactos. Esto indica que el nocodazol puede ser entregado en las células por las partículas de CD3ac funcionalizadas con EGF.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la unión y la captación de la perla por las células pueden producirse a través de la interacción del EGF adsorbido en la superficie de las partículas de CD3ac con el EGFR presente en las células HeLa.

Ejemplo G. Nanopartícula de CD3ac que dirige con IgG

Las nanopartículas de CD3ac que dirigen con IgG pueden prepararse en un procedimiento de una sola etapa como se describe en el presente documento. La Figura 18A muestra que los anticuerpos IgG (por ejemplo, pero no limitados a, IgG anti-transferrina o IgG anti-conejo) pueden ser captados por la nanopartícula de CD3ac. Además, como se muestra en la Figura 18B, la incubación de las nanopartículas de CD3ac funcionalizadas con IgG anti-transferrina con transferrina A-546 generó señales de fluorescencia (indicada mediante puntos blancos), lo que indica que la IgG está presente en la superficie de las nanopartículas de CD3ac y permite la unión de la IgG con transferrina A-546. De forma similar, la incubación de las nanopartículas de CD3ac funcionalizadas con IgG anti-transferrina con un anticuerpo secundario (por ejemplo, puede utilizarse IgG anti-conejo si la IgG anti-transferrina se genera en conejos) también dio como resultado la unión de la IgG presente en la superficie de la nanopartícula de CD3ac con los anticuerpos secundarios (indicada por mediante puntos blancos en la Figura 18C). La orientación de la IgG en la superficie de contacto de las nanopartículas es probablemente isotrópica ("aleatoria"), por ejemplo, el sitio de unión al antígeno y/o el epítipo para los anticuerpos secundarios están expuestos y son accesibles.

Ejemplo 7. Entrega de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) por partículas de péptidos (por ejemplo, partículas de péptido CD3 o partículas de péptidos mixtas que comprenden péptidos CD3ac y CD3)

La transfección de ADN/ARNip puede establecerse mediante una partícula de péptidos que es i) está cargada y ii) es estable. Aunque las partículas de CD3ac (secuencia peptídica mostrada en la Tabla 3) son insolubles en agua, por lo general no están cargadas y por tanto es poco probable que se unan a moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN, incluyendo, pero no limitado a, ARNip). El péptido CD3 (secuencia peptídica mostrada en la Tabla 3) contiene 4 aminas primarias (lisinas 3 + 1 extremo N) que pueden estar ya sea cargadas o acetiladas.

Para evaluar la eficacia de la transfección celular usando péptidos CD3, se incubaron células HeLa con una mezcla de péptidos CD3 (con una secuencia peptídica mostrada en la Tabla 3) y moléculas de ácido nucleico aniónicas (por ejemplo, ADN monocatenario), ambos disueltos en el medio de cultivo celular en una relación molar de aproximadamente 3,7:1 (CD3:ADNmc). Con el fin de visualizar fácilmente la presencia de ADNmc dentro de una célula, una porción del ADNmc añadido al medio de cultivo celular se marcó con un marcador detectable (por ejemplo, Alexa Fluor 488; AF488). Como se muestra en las Figuras 19A-19B, la presencia de péptidos CD3 en el medio de cultivo celular conduce a un aumento de la fluorescencia en el citosol (Figura 19A), en comparación con el control (Figura 19B). Por tanto, una mezcla de péptidos anfifílicos cargados positivamente que se describen en el presente documento (por ejemplo, péptidos CD3) y moléculas de ácido nucleico aniónicas (por ejemplo, ADN o ARN, incluyendo, pero no limitado a, ARNip) puede aumentar la eficiencia de la transfección celular con moléculas de ácido nucleico, en comparación con la transfección celular en ausencia de péptidos anfifílicos cargados positivamente que se describen en el presente documento (por ejemplo, péptidos CD3). Sin desear quedar ligado a teoría alguna, debido a la estructura anfifílica y a los grupos de cabeza catiónica de los péptidos que se describen en el presente documento (por ejemplo, péptidos CD3), algunas realizaciones de los péptidos anfifílicos que se describen en el presente documento (por ejemplo, péptidos CD3) pueden utilizarse como péptidos de penetración celular o agentes de transfección celular.

A continuación se buscó determinar si los péptidos anfifílicos no acetilados (por ejemplo, péptidos CD3) pueden autoensamblarse en presencia de moléculas de ácido nucleico para formar artículos de péptidos que contengan ácido nucleico. Con este fin, una mezcla de péptidos CD3, ADNmc y transferrina se sometió a electroforesis en agarosa (ya que cualesquiera partículas de péptidos formadas serían demasiado grandes para migrar a través del gel de agarosa). Algo del ADNmc de la mezcla se marcó para la visualización de su movimiento en el gel de agarosa, mientras que se añadió transferrina marcada (por ejemplo, AF568-Tfn) a la mezcla de péptido-ácido nucleico para controlar la presencia de partículas de péptidos. (Como se ha descrito anteriormente en los Ejemplos 3-6, generalmente se forma un ligando (por ejemplo, transferrina) añadido a una mezcla de péptidos en la superficie exterior de las partículas de péptidos.) Como se muestra en la Figura 20A, la co-localización de la señal de Tfn-AF568 y la señal de ADNmc-AF488 en la zona de carga de la agarosa después de la electroforesis durante aproximadamente 40 minutos indica que se formaron partículas de péptidos a partir de la mezcla que comprende péptidos CD3 y moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, AF488-ADNmc) y, por tanto, no fueron capaces de migrar en el gel de agarosa a lo largo del tiempo, mientras que otras moléculas de proteína en exceso (por ejemplo, ADNmc y Tfn) migraron hacia el ánodo.

La eficiencia de la coprecipitación de péptidos anfifílicos no acetilados (por ejemplo, péptidos CD3) y moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ADNmc) también se evaluó y se cuantificó, por ejemplo, mediante un método de cromatografía HP-WAX (intercambio aniónico débil). Por ejemplo, se coprecipitaron péptidos CD3 y ADNmc para formar partículas de péptidos que contenían ADNmc antes de la centrifugación y la separación del sobrenadante y el sedimento, ambos de los cuales se sometieron después a una máquina de cromatografía HP-WAX. Como se muestra en la Figura 20B, la mayoría de los péptidos CD3 y ADNmc se detectaron en el sedimento de las partículas de péptidos, en comparación con las cantidades en el sobrenadante, lo que indica que la formación de partículas de péptidos que contienen ADNmc mediante el método de coprecipitación es altamente eficiente.

Hay que señalar que una mezcla de péptidos CD3 y moléculas de ácido nucleico puede autoensamblarse para formar partículas estables en agua pura; sin embargo, generalmente no son estables y se disuelven, en respuesta al aumento de las fuerzas salinas y las temperaturas más altas.

Sin limitaciones, existen dos métodos de ejemplo para disminuir la solubilidad de nanopartículas de péptidos que contienen ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN, incluyendo ARNip). Por ejemplo, el primer enfoque puede implicar una mezcla de péptidos completamente acetilados (por ejemplo, CD3ac con una secuencia peptídica como se muestra en la Tabla 3) y péptidos parcialmente y/o no acetilados (por ejemplo, CD3 con una secuencia peptídica como se muestra en la Tabla 3) durante el ensamblaje de partículas. A pesar de que CD3 es hidrosoluble, puede coprecipitar con CD3ac. Por tanto, la carga neta de una nanopartícula de péptidos puede modularse fácilmente, por ejemplo, mediante el control de la relación de concentración o molar de péptidos parcialmente y/o no acetilados (por ejemplo, CD3) y péptidos totalmente acetilados (por ejemplo, CD3ac). A modo de ejemplo solamente, más CD3ac puede aumentar la estabilidad de las partículas mientras que más CD3 puede proporcionar mayores capacidades de carga para ARNip/ADN, así como un mayor potencial para penetrar las membranas celulares debido a sus cargas netas. Un experto en la materia puede determinar la relación óptima de CD3 a CD3ac en nanopartículas de péptidos mixtas para aplicaciones particulares, por ejemplo, entrega de ARNsi o ADN. En algunas realizaciones, los péptidos parcialmente y/o no acetilados (por ejemplo, CD3) pueden estar presentes entre el 5 % molar y el 50 % molar en nanopartículas de péptidos mixtos. En algunas realizaciones, los péptidos totalmente acetilados (por ejemplo, CD3ac) pueden estar presentes entre el 50 % molar y el 95 % molar en nanopartículas de péptidos mixtas. En diversas realizaciones, las relaciones de concentración o molares de los péptidos parcialmente y/o no acetilados (por ejemplo, CD3) a péptidos completamente acetilados (por ejemplo, CD3ac) pueden variar de aproximadamente 1:100 a aproximadamente 50:1; o de aproximadamente 1:50 a aproximadamente 10:1 o de aproximadamente 1:20 a aproximadamente 1:1.

En consecuencia, en algunas realizaciones, puede prepararse una mezcla de péptidos anfífilos totalmente acetilados (por ejemplo, péptidos CD3ac), péptidos anfífilos parcialmente acetilados o no acetilados (por ejemplo, péptidos CD3) y moléculas de ácidos nucleicos para formar partículas de péptidos estables que contengan moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN, incluyendo ARNip). Por ejemplo, para demostrar la

formación de partículas de péptidos que contenían ácido nucleico estables en condiciones fisiológicas, se añadieron péptidos CD3ac a una mezcla de péptidos CD3 y de ADN monocatenario (ADNmc) en una relación molar de aproximadamente 11:1,8:1 (CD3ac:CD3:ADNmc). Se determinó que la presencia de péptidos CD3ac estabiliza las partículas de péptidos que contienen ADNmc en condiciones fisiológicas. Los tres componentes coprecipitaron para formar partículas de péptidos que contenían ADNmc que eran estables a la fuerza salina correspondiente.

En algunas realizaciones, también puede añadirse un ligando (por ejemplo, transferrina) a la mezcla que comprende péptidos anfífilos totalmente acetilados (por ejemplo, péptidos CD3ac), péptidos anfífilos parcialmente acetilados o no acetilados (por ejemplo, péptidos CD3) y moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN, incluyendo ARNip) para formar partículas de péptidos que contienen ácido nucleico estables frente a la proteína a la que se une el ligando (véanse, por ejemplo, los Ejemplos 3-6 para algunas realizaciones de las partículas de péptidos que se describen en el presente documento para su uso en la entrega dirigida de un principio activo). Por ejemplo, se añadió transferrina (Tfn marcada con AF568 para la facilidad de visualización mediante formación de imágenes) a la mezcla para formar partículas de péptidos estables que contenían ácido nucleico frente a receptores de transferrina presentes en la superficie celular. Como se ha analizado en el ejemplo 3, el ligando (por ejemplo, Tfn) está generalmente presente en la superficie exterior de las partículas de péptidos.

Para determinar la eficiencia de la entrega de partículas de péptidos que contienen ácido nucleico en células, se incubaron células HeLa con partículas de péptidos que contenían ácido nucleico (por ejemplo, formadas a partir de una mezcla de péptidos CD3ac, péptidos CD3 y ADNmc como se ha descrito anteriormente). Como se ha analizado anteriormente, algunos ADNmc en la mezcla se marcaron con un marcador detectable (por ejemplo, AF488) para la facilidad de visualización mediante formación de imágenes. Además, se añadió Tfn-AF568 para formar partículas de péptidos que contenían ácido nucleico como un medio para visualizar las partículas de péptidos formadas. Como se muestra en la Figura 21, la señal de fluorescencia de Tfn-AF568 de las partículas de péptidos formadas se colocó con la señal de fluorescencia de AF488-ADNmc en el citosol, lo que indica que las partículas de péptidos que contienen ADNmc son estables en condiciones fisiológicas y se entregan en las células (por ejemplo, células HeLa).

A continuación se buscó determinar el efecto de las cargas netas de artículos de péptidos que contienen ácidos nucleicos sobre su estabilidad en una condición fisiológica, por ejemplo, en suero. Como se muestra en la Tabla 5 a continuación, se forman partículas de péptidos estables generalmente cuando la relación de cargas catiónicas a cargas aniónicas de las partículas de péptidos que contienen ácido nucleico es cercana a cero (por ejemplo, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 0 o entre aproximadamente 3 y aproximadamente 0). La relación de carga puede ajustarse mediante relaciones molares de moléculas de ácido nucleico aniónicas (por ejemplo, ADNmc) y péptidos anfífilos catiónicos que se describen en el presente documento (por ejemplo, péptidos anfífilos parcialmente acetilados o no acetilados, tales como CD3) en una mezcla de ensamblaje de péptidos. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, una carga neta negativa de las partículas de péptidos (por ejemplo, una relación de cargas catiónicas a cargas aniónicas menor de 1) puede ayudar a prevenir la agregación de partículas.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, mientras que las cargas netas de los artículos de péptidos que contienen ácido nucleico pueden influir en la estabilidad de las partículas en condiciones fisiológicas, la cantidad de péptidos anfífilos totalmente acetilados (por ejemplo, péptidos CD3ac) respecto a los péptidos anfífilos no acetilados (por ejemplo, péptidos CD3) también puede contribuir a la estabilidad de las partículas. Por ejemplo, como se ha analizado anteriormente, una mezcla de péptidos anfífilos no acetilados (por ejemplo, péptidos CD3) y moléculas de ácido nucleico puede autoensamblarse para formar partículas; sin embargo, generalmente no son estables y se disuelven, en respuesta al aumento de las fuerzas salinas y las temperaturas más altas. Por el contrario, las partículas de péptidos formadas a partir de péptidos anfífilos totalmente acetilados (por ejemplo, péptidos CD3ac) son más estables. En consecuencia, el aumento de la relación molar de los péptidos anfífilos totalmente acetilados (por ejemplo, CD3ac) a los péptidos anfífilos no acetilados (por ejemplo, CD3) puede aumentar la estabilidad de las partículas de péptidos resultantes en una condición fisiológica, por ejemplo, en suero, los que está de acuerdo con los datos mostrados en la Tabla 5.

Tabla 5. Efectos de las relaciones de carga (o relaciones molares) en una mezcla de péptidos sobre la estabilidad de las partículas de péptido resultantes en suero

Composición de la mezcla de ensamblaje de péptidos		Relación molar (ADNmc:CD3ac:CD3)	Relación de cargas (catión:anión)	Estabilidad en suero
CD3	1,23e-04 M	1:200:200	33,065	Menos estable
CD3ac	1,23e-04 M			
ADNmc	6,20e-07 M			

CD3	1,23e-05 M	1:200:20	3,306	Estable
CD3ac	1,23e-04 M			
ADNmc	6,20e-07 M			
CD3	1,23e-06 M	1:200:2	0,331	Estable
CD3ac	1,23e-04 M			
ADNmc	6,20e-07 M			

El segundo enfoque para disminuir la solubilidad de las nanopartículas de péptidos que contienen ADN/ARNip puede implicar la síntesis a medida de un único péptido con un grado de acetilación, por ejemplo, que varía de la acetilación de al menos un grupo amino en el segmento de peptidilo hidrófilo del péptido anfifílico se describe en el presente documento a la acetilación completa de todos los grupos amino en el segmento de peptidilo hidrófilo del péptido anfifílico que se describe en el presente documento. A modo de ejemplo solamente, un péptido anfifílico puede sintetizarse a medida con un grado de acetilación entre CD3 y CD3ac. Por ejemplo, un péptido anfifílico puede sintetizarse a medida con al menos un grupo cargado o no acetilado, por ejemplo, en el extremo N, que incluye al menos dos grupos cargados o no acetilados o al menos tres grupos cargados o no acetilados. En una realización, el péptido anfifílico puede diseñarse para que sea catiónico (por ejemplo, para la entrega de ARNip o ADN) mediante la modulación de las cargas hacia o en su extremo N (por ejemplo, con acetilación) para proporcionar el carácter anfifílico de la molécula. Por ejemplo, al menos un grupo amino (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más grupos amino, dependiendo del número de grupos amino presentes en el segmento de peptidilo hidrófilo) del segmento de peptidilo hidrófilo del péptido anfifílico descrito puede permanecer no acetilado y al menos un grupo amino (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más grupos amino, dependiendo del número de grupos amino presentes en el segmento de peptidilo hidrófilo) del segmento de peptidilo hidrófilo del anfifílico péptido descrito puede ser acetilado. En ciertas realizaciones, dicho péptido anfifílico puede comprender una secuencia de aminoácidos de H-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH₂. En algunas realizaciones, el péptido anfifílico puede comprender una secuencia de aminoácidos de H-LK-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH₂. En realizaciones alternativas, el péptido anfifílico puede comprender una secuencia de aminoácidos de H-LK-LK-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH₂. La relación de grupos amino acetilados a grupos amino no acetilados en un péptido anfifílico puede controlar las propiedades catiónicas y aniónicas de los péptidos anfifílicos que se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, la relación de grupos amino acetilados a grupos amino no acetilados en un péptido anfifílico puede ser inferior a 1, aproximadamente 1 o superior a 1.

Ejemplo 8. Estabilidad de partículas de péptidos que contienen ácido nucleico (por ejemplo, partículas de péptido CD3 o partículas de péptidos mixtas que comprenden péptidos CD3ac y CD3)

La estabilidad de las partículas de péptido CD3 que contienen ácido nucleico se caracterizó en agua pura. A continuación se muestra una formulación de partículas de péptido CD3 de ejemplo que comprende adicionalmente moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ADNmc) y un ligando (por ejemplo, transferrina, Tfn):

Formulación de partícula de péptidos 1 (CD3 + ADNmc + Tfn)

CD3 (H-LK-LK-LK-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH₂)⁴⁺ 21 µM
 (5'-TTGTGCCGCCTTTGCAGGTGTATC-3')²⁴⁻ 5,4 µM
 (AF488-5'-TTGTGCCGCCTTTGCAGGTGTATC-3')²⁴⁻ 0,24 µM
 Tfn-AF568 4,14 ug/ml

Para evaluar la estabilidad de las partículas de péptidos formadas a partir de la formulación 1 (PNP1) en agua, una muestra de las partículas de péptidos PNP1 se agitó en un tubo eppendorf que contenía agua durante aproximadamente 15 minutos ya sea a aproximadamente temperatura ambiente o a aproximadamente 37 °C. Después, la muestra de PNP1 se centrifugó para precipitar las partículas de péptidos y el sobrenadante se recogió para su posterior análisis. La concentración de Tfn-AF568 en el sobrenadante se midió y se cuantificó por su intensidad de fluorescencia. Como se muestra en la Figura 22A, se detectó una mayor concentración de Tfn-AF568 en el sobrenadante de la muestra de PNP1 agitada a una temperatura de aproximadamente 37 °C que a aproximadamente a temperatura ambiente, lo que indica que la estabilidad de las partículas PNP1 en agua es dependiente de la temperatura y más partículas PNP1 tienden a disociarse a una temperatura superior, liberando de este modo una mayor cantidad de Tfn-AF568 al sobrenadante.

También se realizó un estudio de la estabilidad de PNP1 en agua en el transcurso del tiempo. Se agitaron muestras de las partículas PNP1 en tubos eppendorf que contenían agua a una temperatura de ya sea aproximadamente 4 °C o aproximadamente 37 °C. En cada punto temporal predeterminado (como se indica en la Figura 22B), se centrifugó una muestra de PNP1 para sedimentar las partículas de péptidos y el sobrenadante se recogió para su posterior análisis. La concentración de Tfn-AF568 en el sobrenadante se midió y se cuantificó mediante intensidad de fluorescencia. De forma similar a la Figura 22A, la Figura 22B muestra que la estabilidad de las partículas PNP1 en agua es dependiente de la temperatura y las partículas PNP1 tienden a disociarse más rápido a una temperatura superior, por ejemplo, a una temperatura superior a 4 °C.

A continuación se buscó comparar la estabilidad de partículas PNP1 y partículas de péptidos formadas a partir de la formulación 2 (PNP2), como se muestra a continuación, en medios de cultivo celular, por ejemplo, que contenían aproximadamente suero al 10 %.

5 Formulación de partícula de péptidos 2 (CD3ac + CD3 + ADNmc + Tfn)

CD3ac (Ac-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH₂) 123 µM

CD3 (H-LK-LK-LK-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH₂)⁴⁺ 21 µM

(5'-TTGTGCCGCCTTTGCAGGTGTATC-3')²⁴⁻ 5,4 µM

10 (AF488-5'-TTGTGCCGCCTTTGCAGGTGTATC-3')²⁴⁻ 0,24 µM

Tfn-AF568 4, 14 ug/ml

Se incubaron células HeLa con partículas ya sea PNP1 o PNP2 durante aproximadamente 30 minutos a temperaturas de aproximadamente 4 °C y 37 °C. Como las células HeLa, en general, realizan la endocitosis mediada por clatrina a aproximadamente 37 °C, pero no a aproximadamente 4 °C, cualquier Tfn-AF 568 disuelto en los medios será internalizado por las células. Por tanto, después de la incubación, las células se fijaron con paraformaldehído para la formación de imágenes y la detección de la intensidad de fluorescencia. Como se muestra en los paneles superiores de la Figura 22C, se detectó una señal de fluorescencia de Tfn-AF568 difusa y más fuerte en el citosol cuando las células se incubaron con las partículas PNP1 a aproximadamente 37 °C, en comparación con la fluorescencia de Tfn-AF568 más punteada detectada en las células incubadas a aproximadamente 4 °C. Sin embargo, este contraste no se observó en las células incubadas con las partículas PNP2, como se muestra en los paneles inferiores de la Figura 22C. En su lugar, se observaron señales de fluorescencia Tfn-AF568 punteadas y comparables tanto en las células incubadas a aproximadamente 4 °C como a aproximadamente 37 °C, en presencia de las partículas PNP2. Estos resultados indican que las partículas PNP1 tienden a disociarse a aproximadamente 37 °C, liberando de este modo Tfn-AF568 al medio de cultivo, que después es internalizado por las células; mientras que las partículas PNP2 parecen ser más estables en suero (por ejemplo, aproximadamente suero al 10 %) a aproximadamente 37 °C durante al menos aproximadamente 30 minutos, conservando de este modo la mayor parte del Tfn-AF568 en las partículas PNP2 y/o en la superficie de las partículas PNP2.

La comparación de las células de la Figura 22C con el control negativo (es decir, las células incubadas en presencia de ADNmc sin péptidos CD3 o CD3ac) se muestra en la Figura 22D, la intensidad de fluorescencia de AF488-ADNmc en el control negativo es significativamente menor que en las células incubadas con partículas PNP1 o PNP2 que contenían ADNmc. Esto indica que las partículas PNP1 o PNP2 pueden utilizarse para facilitar la transfección celular y entregar una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) a una célula. Se observa que también se detectó fluorescencia de AF488-ADNmc en las células incubadas en presencia de partículas PNP1 o PNP2 a aproximadamente 4 °C. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, aunque es poco probable que la transfección celular en presencia de partículas PNP1 o PNP2 a aproximadamente 4 °C sea dependiente de TfR (receptor de transferrina), probablemente es provocada por el transporte pasivo a través de la membrana celular en presencia de péptidos CD3 como se ha analizado en el Ejemplo 7.

Referencias (para los Ejemplos 1-2)

[1] H. Goesmann, C. Feldmann, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, 49, 1362.

[2] [2a] Y. Kakizawa, R. Nishio, T. Hirano, Y. Koshi, M. Nukiwa, M. Koiwa, J. Michizoe, N. Ida, *J. Control Release* 142, 8; [2b] K. Kita-Tokarczyk, J. Grumelard, T. Haefele, W. Meier, *Polymer* 2005, 46, 3540; [2c] L. Zhang, J. M. Chan, F. X. Gu, J.-W. Rhee, A. Z. Wang, A. F. Radovic-Moreno, F. Alexis, R. Langer, O. C. Farokhzad, *ACS Nan* 2008, 2, 1696; [2d] A. Blanz, S. P. Armes, A. J. Ryan, *Macromol. Rapid Commun.* 2009, 30, 267; [2e] T. Smart, H. Lomas, M. Massignani, M. V. Flores-Merino, L. R. Perez, G. Battaglia, *Nano Today* 2008, 3, 38.

[3] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces: With Applications to Colloidal and Biological Systems*, American Chemical Society, 1985, pág. 296.

[4] [4a] S. Rai, R. Paliwal, P. N. Gupta, K. Khatri, A. K. Goyal, B. Vaidya, S. P. Vyas, *Curr. Nanosci.* 2008, 4, 30; [4b] Y. Liu, K. Li, J. Pan, B. Liu, S.-S. Feng, *Biomaterials* 2009, 31, 330.

[5] D. Nishit, M. Samir, *Adv. Funct. Mater.* 2009, 9999, NA-NA.

[6] C. Lo Presti, H. Lomas, M. Massignani, T. Smart, G. Battaglia, *J. Mater. Chem.* 2009, 19, 3576.

[7] U. K. Slotta, S. Rammensee, S. Gorb, T. Scheibel, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2008, 47, 4592.

[8] S. Raman, G. Machaidze, A. Lustig, U. Aebi, P. Burkhard, *Nanomedicine* 2006, 2, 95.

[9] [9a] M. Nigen, C. Gaillard, T. Croguennec, M.-N. Madec, S. Bouhallab, *Biophys. Chem.* 2009, 146, 30; [9b] M. Nigen, T. Croguennec, D. Renard, S. Bouhallab, *Biochemistry* 2007, 46, 1248.

[10] T. E. Rajapaksa, M. Stover-Hamer, X. Fernandez, H. A. Eckelhoefer, D. D. Lo, T. E. Rajapaksa, *J. Control Release* 2009.

[11] [11a] Q. Sun, S. Cai, B. R. Peterson, Q. Sun, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 10064. [11b] S. Yang, D. J. Coles, A. Esposito, D. J. Mitchell, I. Toth, R. F. Minchin, S. Yang, *J. Controlled Release* 2009, 135, 159.

[12] M. G. Ryadnov, A. Bella, S. Timson, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 13240.

[13] [13a] L. Aulisa, H. Dong, J. D. Hartgerink, *Biomacromolecules* 2009, 10, 2694; [13b] K. J. Channon, G. L. Devlin, C. E. MacPhee, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 12520; [13c] J. Ryu, C. B. Park, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2009, 48, 4820, S4820/4821-S4820/ 4826; [13d] H. Dong, S. E. Paramonov, J. D. Hartgerink, *J. Am. Chem. Soc.*

- 2008, 130, 13691; [13e] Y. Zimenkov, S. N. Dublin, R. Ni, R. S. Tu, V. Breedveld, R. P. Apkarian, V. P. Conticello, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 6770.
 [14] Vydac, <http://www.nestgrp.com/pdf/Vapp/AN9802.pdf> 2010.
 [15] [15a] H. M. Redhead, S. S. Davis, L. Illum, *J. Controlled Release* 2001, 70,353; [15b] W. Lin, M. C. Garnett, S. S. Davis, E. Schacht, P. Ferruti, L. Illum, *J. Controlled Release* 2001,71,117.
 [16] W. R. Veatch, E. T. Fossel, E. R. Blout, *Biochemistry* 1974, 13, 5249.
 [17] [17a] D. A. Kelkar, A. Chattopadhyay, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 2007, 1768, 2011; [17b] R. D. Hotchkiss, R. Dubos, *J. Biol. Chem.* 1940, 132, 791; [17c] R. D. Hotchkiss, R. Dubos, *J. Biol. Chem.* 1940, 132, 793. [18] [18a] D. W. Urry, D. F. Mayers, J. Haider, *Biochemistry* 1972, 11, 487; [18b] Y. Chen, A. Tucker, B. A. Wallace, *J. Mol. Biol.* 1996, 264, 757; [18c] D. A. Doyle, B. A. Wallace, *J. Mol. Biol.* 1997, 266, 963.
 [19] [19a] F. Heitz, A. Heitz, Y. Trudelle, *Biophys. Chem.* 1986, 24, 149; [19b] S. V. Sychev, N. A. Nevskaya, S. Iordanov, E. N. Shepel, A. I. Miroshnikov, V. T. Ivanov, *Bioorg. Chem.* 1980, 9, 121.
 [20] L. Eidenschink, B. L. Kier, K. N. L. Huggins, N. H. Andersen, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* 2009, 75, 308.

Referencias (para los Ejemplos 3-4)

- (1) *Multifunctional nanocarriers*. *Adv Drug Deliv* 58, 1532-1555 (2006).
- (2) Stark. *Nanoparticles in Biological Systems*. *Angew Chem Int Ed*, n-a, doi: 10.1002/anie.200906684 (2011).
- (3) Soussan, E., Cassel, S., Blanzat, M. y Rico-Lattes, I. *Drug delivery by soft matter: matrix and vesicular carriers*. *ACIE* 48, 274-288, doi:10.1002/anie.200802453 (2009).
- (4) Nel, A. E. et al. *Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface*. *Nat Mater* 8, 543-557, doi: 10.1038/nmat2442 (2009).
- (5) Dittrich, C. y Meier, W. *Solid Peptide Nanoparticles: Structural Characterization and Quantification of Cargo Encapsulation*. *Macromolecular Bioscience* 10, 1406-1415, doi: 10.1002/mabi.201000221 (2010).
- (6) Merrifield, R. B. *Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide*. *J Am* 85, 2149-2154, doi: 10.1021/ja00897a025 (1963).
- (7) Nilsson, B. L., Soellner, M. B. y Raines, R. T. *Chemical synthesis of proteins*. *Annu Rev Bioph Biom* 34, 91-118, doi: 10.1146/annurev.biophys.34.040204.144700 (2005).
- (8) Sitnikova, N. L., Sprik, R., Wegdam, G. y Eiser, E. *Spontaneously formed trans-anethol/water/alcohol emulsions: mechanism of formation and stability*. *LAGMUIR* 21, 7083-7089, doi: 10.1021/la0468161 (2005).
- (9) Ashley, C. E. et al. *The targeted delivery of multicomponent cargos to cancer cells by nanoporous particlesupported lipid bilayers*. *Nature*, doi: 10.1038/nmat2992 (2011).
- (10) Monopoli, M. P. et al. *Physical-Chemical Aspects of Protein Corona: Relevance to in Vitro and in Vivo Biological Impacts of Nanoparticles*. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 2525-2534, doi: 10.1021/ja107583h (2011).
- (11) Ehrlich, M. et al. *Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits*. *CEL* 118, 591-605, doi: 10.1016/j.cell.2004.08.017 (2004).
- (12) MacGillivray, R. T. A. et al. *Two High-Resolution Crystal Structures of the Recombinant N-Lobe of Human Transferrin Reveal a Structural Change Implicated in Iron Release*. *Biochemistry* 37, 7919-7928, doi: 10.1021/bi980355j (1998).
- (13) Min, Y., Akbulut, M., Kristiansen, K., Golan, Y. y Israelachvili, J. *The role of interparticle and external forces in nanoparticle assembly*. *Nat. Mater.* 7, 527-538, doi: 10.1038/nmat2206 (2008).
- (14) Fleck, C. C. y Netz, R. R. *Electrostatic colloid-membrane binding*. *Europhys. Lett.* 67, 314-320, doi: 10.1209/epl/i2004-10068-x (2004).
- (15) Dagastine, R. R. et al. *Dynamic Forces Between Two Deformable Oil Droplets in Water*. *Science* (Washington, DC, United States) 313, 210-213, doi: 10.1126/science.1125527 (2006).
- (16) McGraw, T. E., Greenfield, L. y Maxfield, F. R. *Functional expression of the human transferrin receptor cDNA in Chinese hamster ovary cells deficient in endogenous transferrin receptor*. *JCB* 105, 207-214, doi: 10.2307/1612534 (1987).
- (17) Parhi, P., Golas, A., Bamthip, N., Noh, H. y Vogler, E. A. *Volumetric interpretation of protein adsorption: Capacity scaling with adsorbate molecular weight and adsorbent surface energy*. *Biomaterials* 30, 6814-6824, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.005 (2009).
- (18) Harding, C., Heuser, J. y Stahl, P. *Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes*. *JCB* 97, 329-339, doi: 10.2307/1610388 (1983).
- (19) Lillo, M. P., Canadas, O., Dale, R. E. y Acuna, A. U. *Location and properties of the taxol binding center in microtubules: a picosecond laser study with fluorescent taxoids*. *Biochemist* 41, 12436-12449 (2002).
- (20) Jordan, M. A. y Wilson, L. *Microtubules as a target for anticancer drugs*. *Nat Rev Can* 4, 253-265, doi: 10.1038/nrc1317 (2004).
- (21) Stewart, K. M., Horton, K. L. y Kelley, S. O. *Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine*. *Org Biomol Chem* 6, 2242-2255, doi: 10.1039/b719950c (2008).
- (22) Hyuk, I. S., Jeong, U. y Xia, Y. *Polymer hollow particles with controllable holes in their surfaces*. *Nat. Mater.* 4, 671-675, doi: 10.1038/nmat1448 (2005).

Estas publicaciones se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada a este respecto debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anteceder dicha divulgación en virtud de la invención anterior o por cualquier otra razón. Todas las declaraciones en cuanto a la fecha o representación en cuanto al contenido de estos documentos se basan en la

información disponible para los solicitantes y no constituyen admisión alguna en cuanto a la exactitud de las fechas o contenidos de estos documentos.

REIVINDICACIONES

1. Una partícula de péptidos que comprende un péptido anfifílico, comprendiendo el péptido anfifílico un segmento de peptidilo hidrófobo y un segmento de peptidilo hidrófilo,
 5 en la que el segmento de peptidilo hidrófobo consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de $(\text{Trp-Leu})_m-(\text{Trp})_n$ o $(\text{Leu-Trp})_p-(\text{Leu})_q$, en las que cada Trp es D-Trp o L-Trp y cada Leu es D-Leu o L-Leu, m y p son independientemente un número entero de 1 a 5 y n y q son independientemente 0 o 1, a condición de que cuando Trp es D-Trp entonces Leu es L-Leu, y cuando Trp es L-Trp entonces Leu es D-Leu o viceversa; y
 10 en la que el segmento de peptidilo hidrófilo consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de $(\text{Lys})_r$, en la que r es un número entero de 1 a 15, y
 en la que la partícula de péptidos comprende adicionalmente en su superficie exterior un ligando para la unión a una célula diana.
2. La partícula de péptidos de la reivindicación 1, en la que al menos un resto de Lys del segmento de peptidilo hidrófilo o el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico están acetilados.
 15
3. La partícula de péptidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que el péptido anfifílico comprende la secuencia de aminoácidos de $(\text{L-Lys})-(\text{L-Lys})-(\text{L-Lys})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-\text{X}$, en donde X está ausente o es NH_2 ; opcionalmente
 20 en la que al menos uno de los restos de L-Lys está acetilado y/o el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico está acetilado.
4. La partícula de péptidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el ligando incluye un ligando de receptor de superficie celular o un anticuerpo.
 25
5. La partícula de péptidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la partícula de péptidos comprende una mezcla de un péptido anfifílico totalmente acetilado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un péptido anfifílico parcialmente acetilado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y opcionalmente un péptido anfifílico no acetilado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
 30
6. La partícula de péptidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende adicionalmente un principio activo.
7. La partícula de péptidos de la reivindicación 6 para su uso en un método de tratamiento de un sujeto mediante terapia, en donde el método comprende la administración de la partícula de péptidos al sujeto.
 35
8. La partícula de péptidos de la reivindicación 6 para su uso en un método de tratamiento de un tejido enfermo en un sujeto, en donde el método comprende la administración de la partícula de péptidos al sujeto y en donde la partícula de péptidos comprende un principio activo que comprende un material radiactivo.
 40
9. La partícula de péptidos para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el tejido enfermo es un tumor o una malformación arteriovenosa.
10. Uso *in vitro* de la partícula de péptidos de la reivindicación 6 para el suministro dirigido de un principio activo.
 45
11. Uso *in vitro* de una composición que comprende un péptido anfifílico cargado positivamente como agente de penetración celular o agente de transfección, en el que el péptido anfifílico cargado positivamente comprende un segmento de peptidilo hidrófobo y un segmento de peptidilo hidrófilo,
 en el que el segmento de peptidilo hidrófobo comprende una secuencia de aminoácidos de $(\text{Trp-Leu})_m-(\text{Trp})_n$ o $(\text{Leu-Trp})_p-(\text{Leu})_q$, en las que cada Trp es D-Trp o L-Trp y cada Leu es D-Leu o L-Leu, m y p son independientemente un número entero de 1 a 5 y n y q son independientemente 0 o 1, a condición de que cuando Trp es D-Trp entonces Leu es L-Leu y cuando Trp es L-Trp entonces Leu es D-Leu o viceversa;
 50 en el que el segmento de peptidilo hidrófilo comprende una secuencia de aminoácidos de $(\text{Lys})_r$, en la que r es un número entero de 1 a 15; y
 en el que al menos uno de los restos de Lys o el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico no están acetilados; opcionalmente
 55 en el que todos los restos de Lys y el grupo amino del extremo N del péptido anfifílico no están acetilados.
12. El uso *in vitro* de la reivindicación 11, en el que el péptido anfifílico comprende la secuencia de aminoácidos de $(\text{L-Lys})-(\text{L-Lys})-(\text{L-Lys})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-(\text{D-Leu})-(\text{L-Trp})-\text{X}$, en la que X está ausente o es NH_2 .
 60
13. El uso *in vitro* de cualquiera de las reivindicaciones 11-12, en el que la composición comprende adicionalmente una molécula de ácido nucleico que hay que suministrar a una célula.
14. Una partícula de péptidos que comprende un primer péptido anfifílico y un segundo péptido anfifílico, comprendiendo el primer y el segundo péptidos anfifílicos cada uno, independientemente, un segmento de peptidilo
 65

hidrófobo y un segmento de peptidilo hidrófilo,

en la que el segmento de peptidilo hidrófobo consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de (Trp-Leu)_m-(Trp)_n o (Leu-Trp)_p-(Leu)_q, en las que cada Trp es D-Trp o L-Trp y cada Leu es D-Leu o L-Leu, m y p son independientemente un número entero de 1 a 5 y n y q son independientemente 0 o 1, a condición de que cuando

- 5 Trp es D-Trp entonces Leu es L-Leu y cuando Trp es L-Trp entonces Leu es D-Leu o viceversa; y
 en la que el segmento de peptidilo hidrófilo consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de (Lys)_r, en la que r es un número entero de 1 a 15, y
 en la que el grupo amino del extremo N y todos los restos de Lys del primer péptido anfifílico están acetilados; y
 en la que al menos el grupo amino del extremo N o uno de los restos de Lys del segundo péptido anfifílico no están
 10 acetilados; opcionalmente en la que ninguno de entre el grupo amino del extremo N y los restos de Lys del segundo péptido anfifílico está acetilado.

15. La partícula de péptidos de la reivindicación 14, que comprende adicionalmente un principio activo; opcionalmente

- 15 en la que el principio activo incluye una molécula de ácido nucleico.

16. La partícula de péptidos de cualquiera de las reivindicaciones 14-15, que comprende adicionalmente en su superficie exterior un ligando.

- 20 17. La partícula de péptidos de cualquiera de las reivindicaciones 14-16, en la que el primer y el segundo péptidos anfifílicos comprenden cada uno independientemente la secuencia de aminoácidos de (L-Lys)-(L-Lys)-(L-Lys)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-(D-Leu)-(L-Trp)-X, en la que X está ausente o es NH₂.

- 25 18. Uso *in vitro* de la partícula de péptidos de cualquiera de las reivindicaciones 14-17 para el suministro de una molécula de ácido nucleico a una célula; opcionalmente en el que la molécula de ácido nucleico incluye ARNip, ARNmi, ARNhc, ADN o cualquier combinación de los mismos.

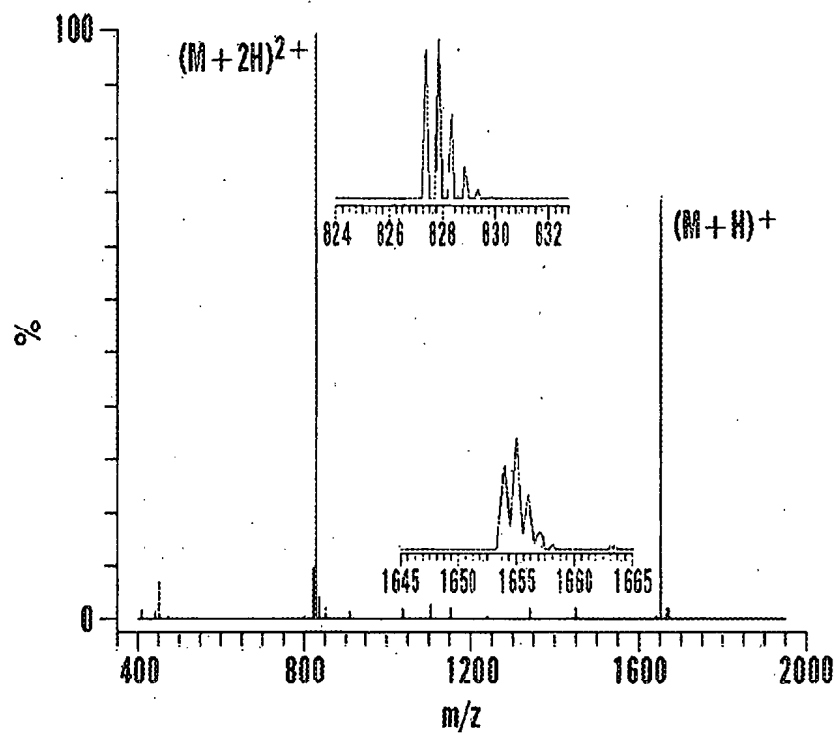


FIG. 1A

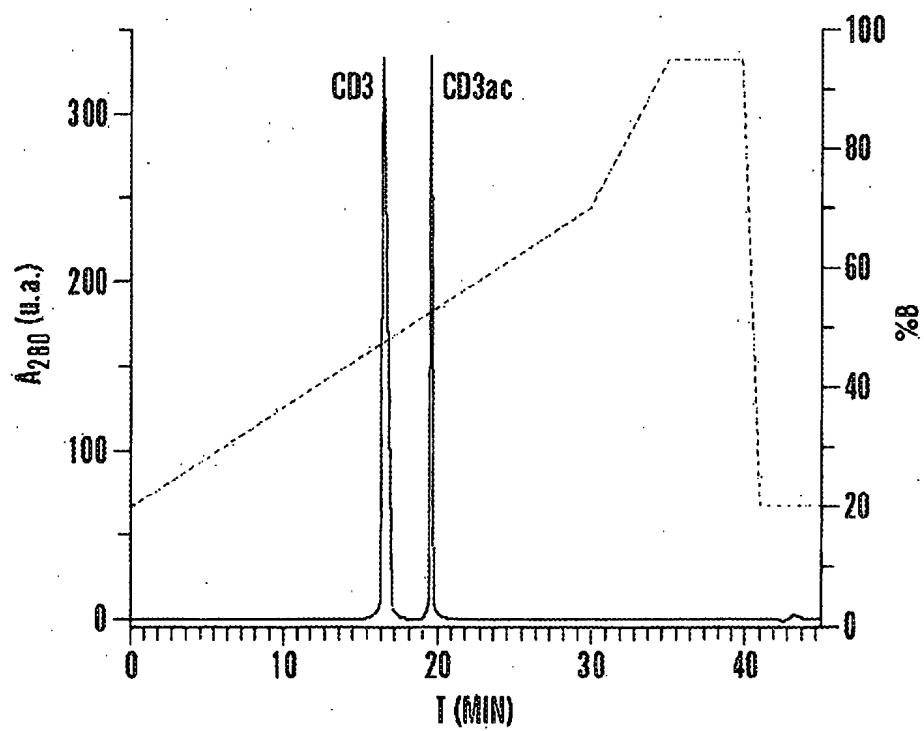


FIG. 1B

FIG. 2A

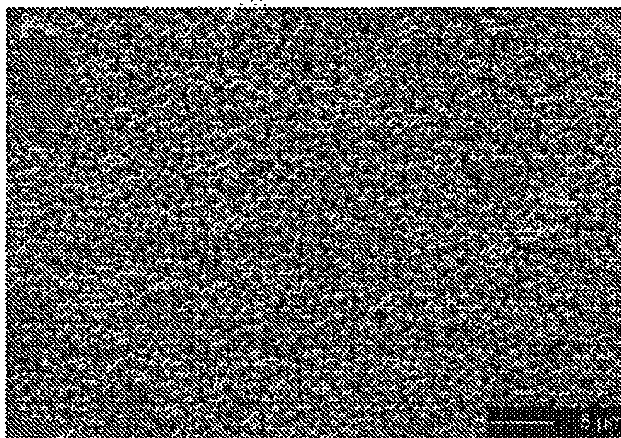


FIG. 2B

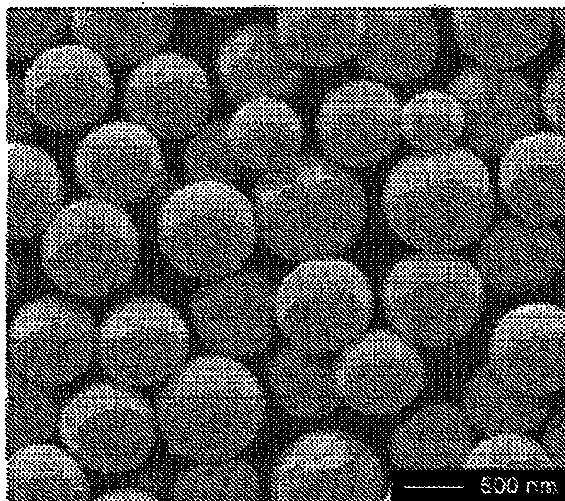


FIG. 2C



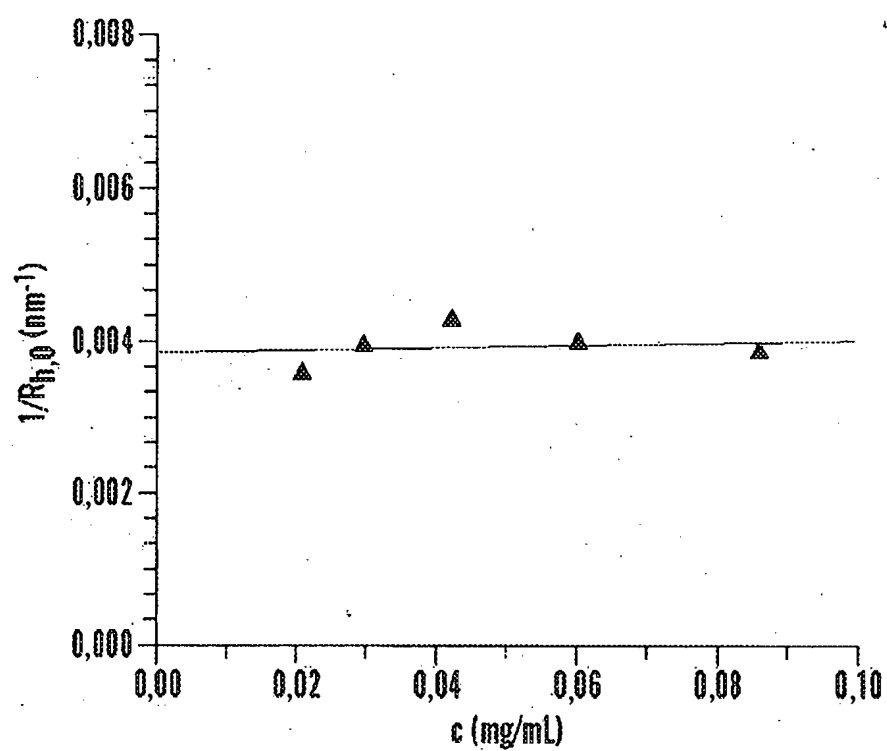
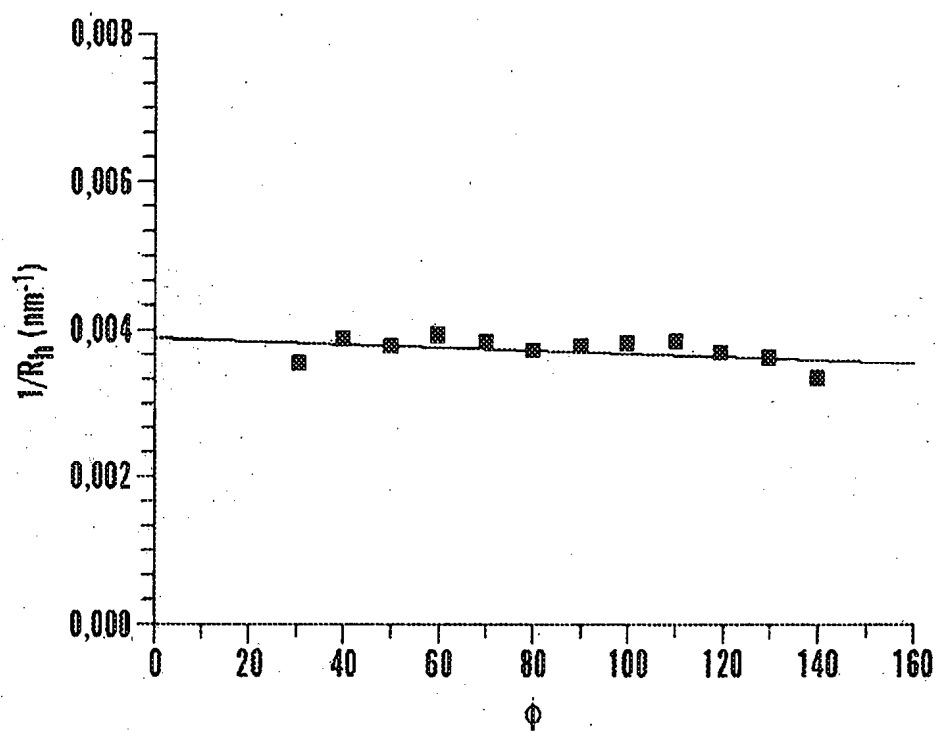
**FIG. 3A****FIG. 3B**

FIG. 4

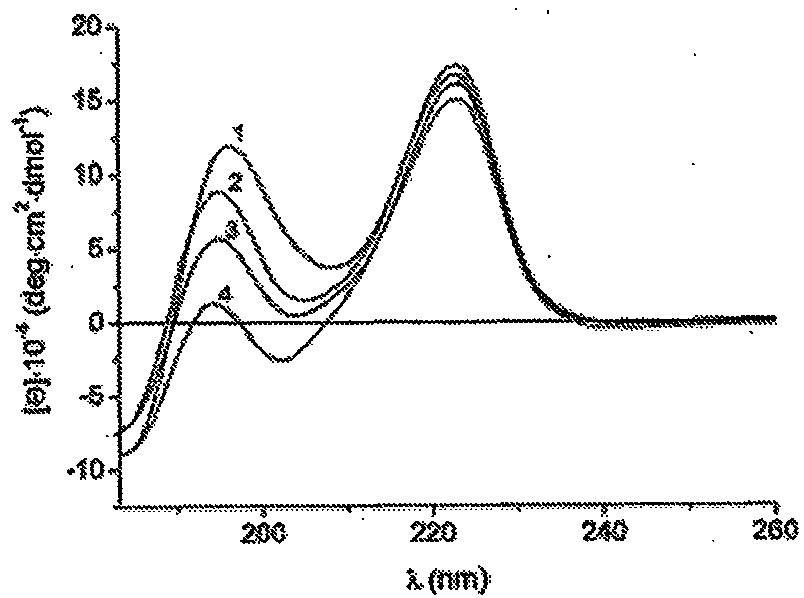


FIG. 5A

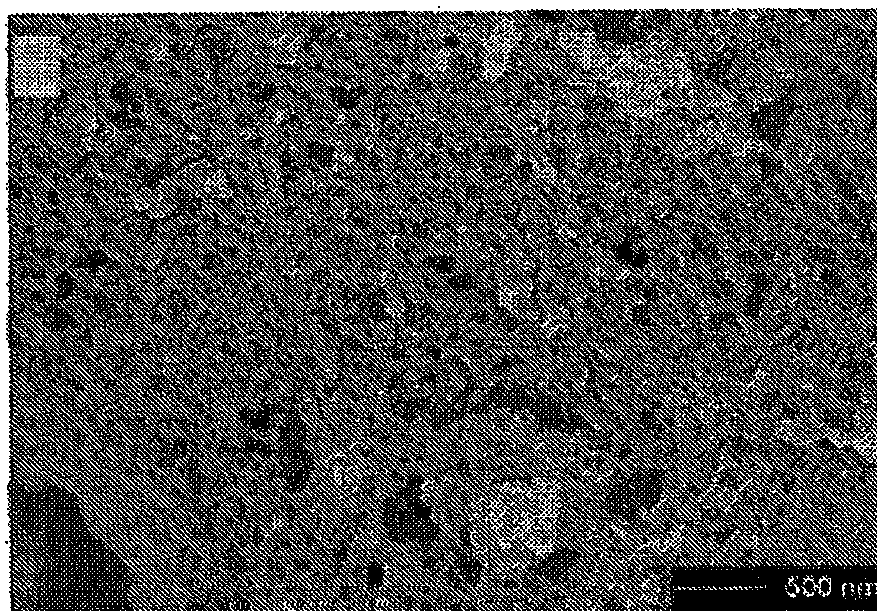


FIG. 5B

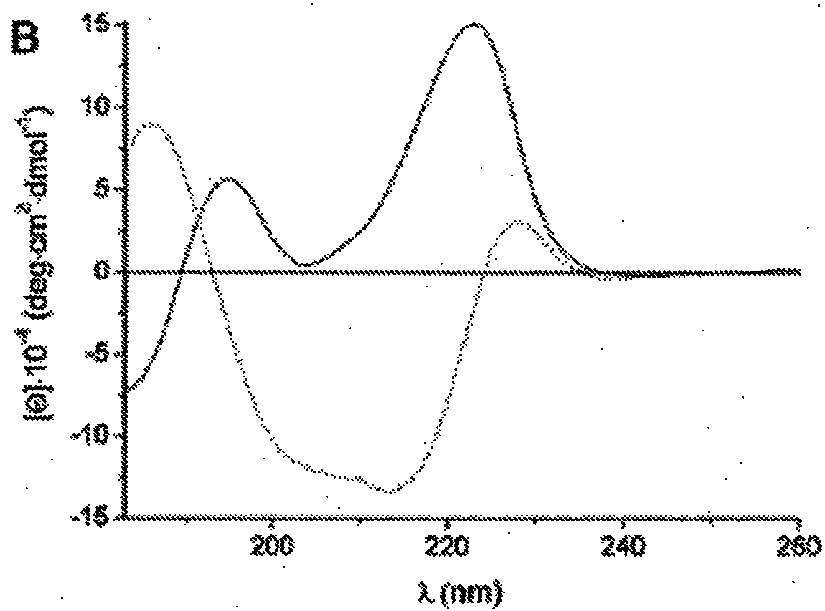


FIG. 6A

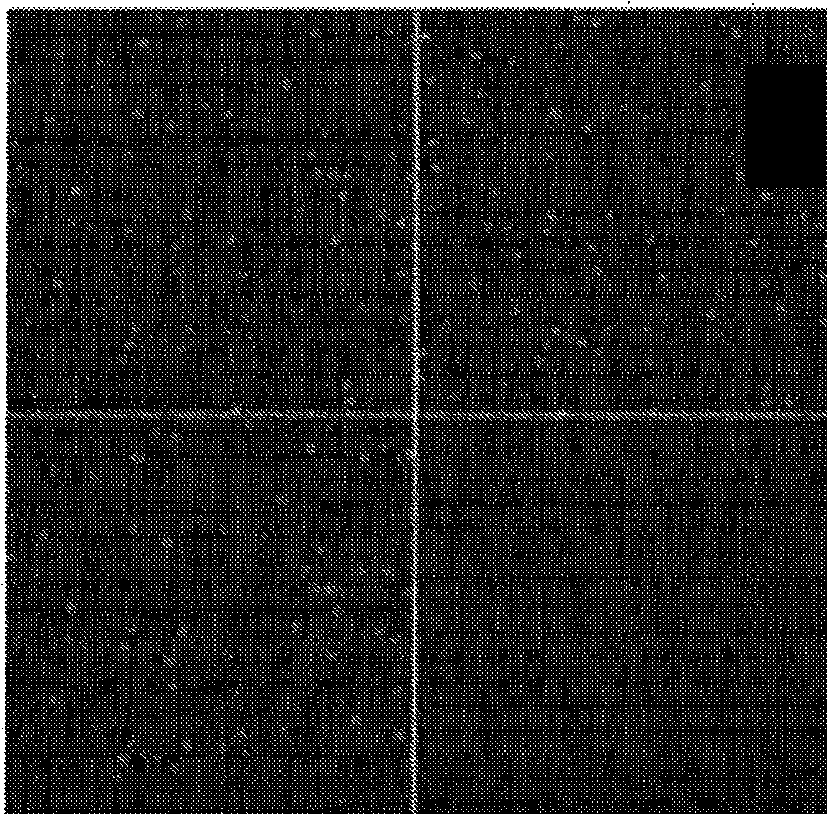


FIG. 6B

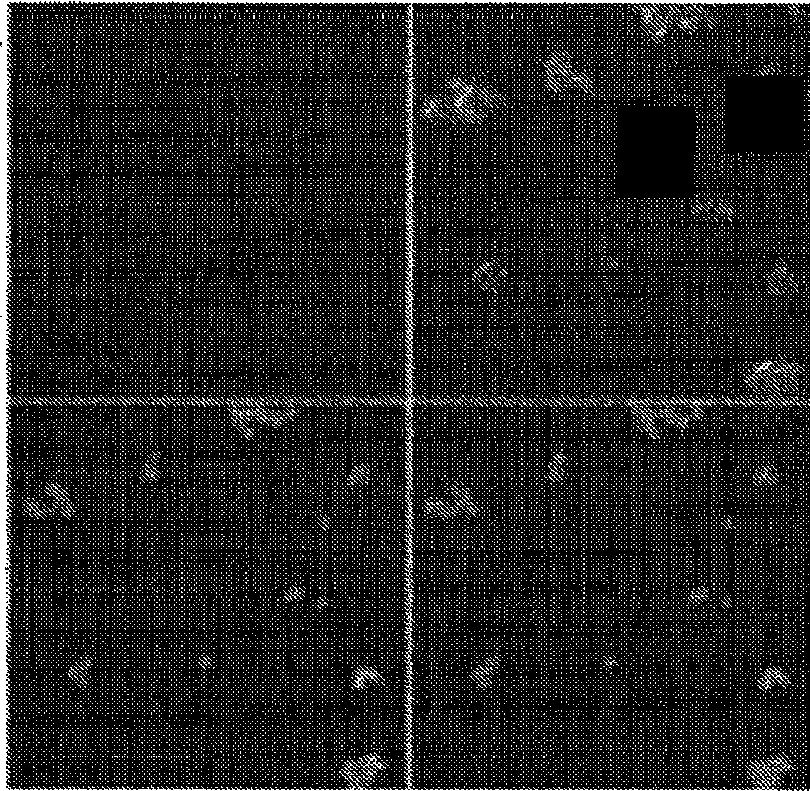
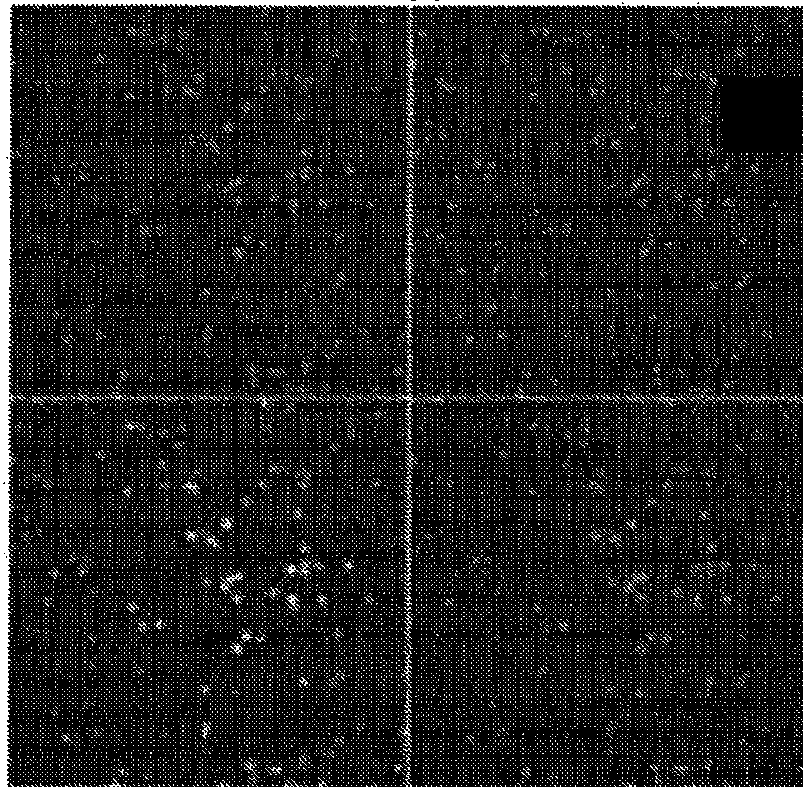


FIG. 6C



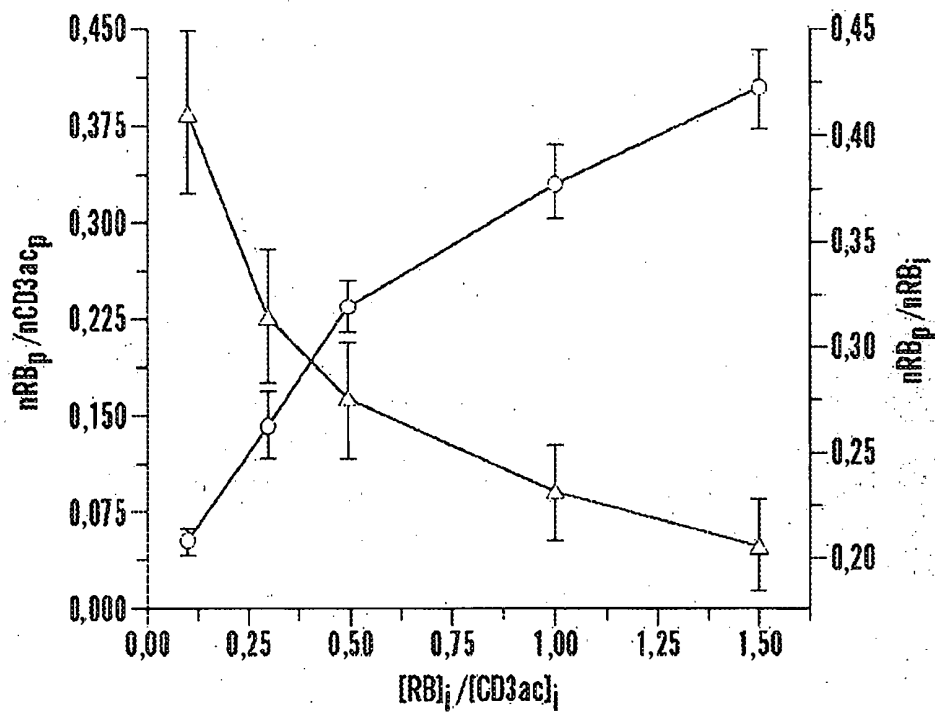


FIG. 7A

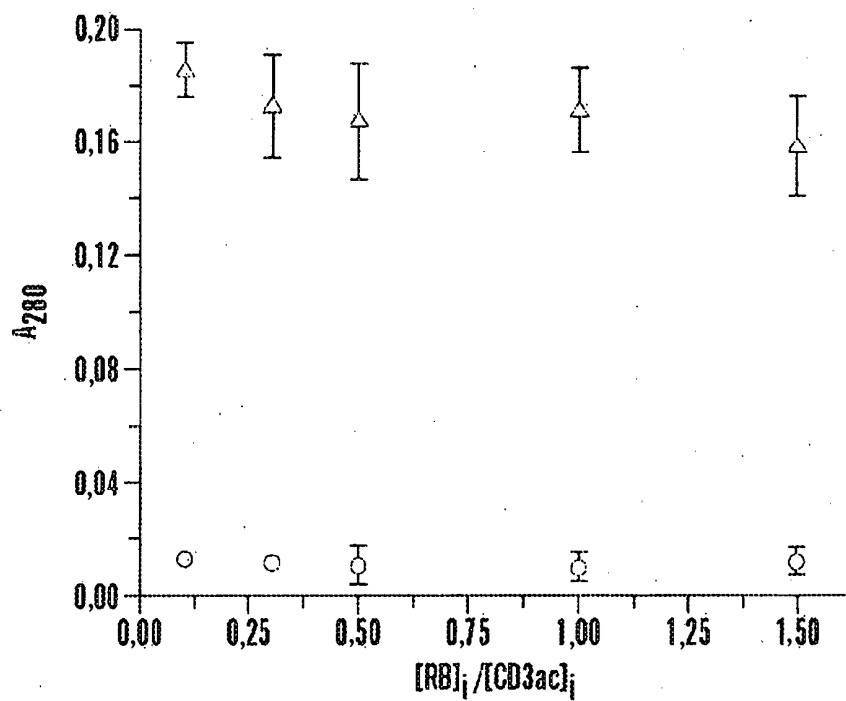


FIG. 7B

FIG. 8A

Antes de la tripsinación

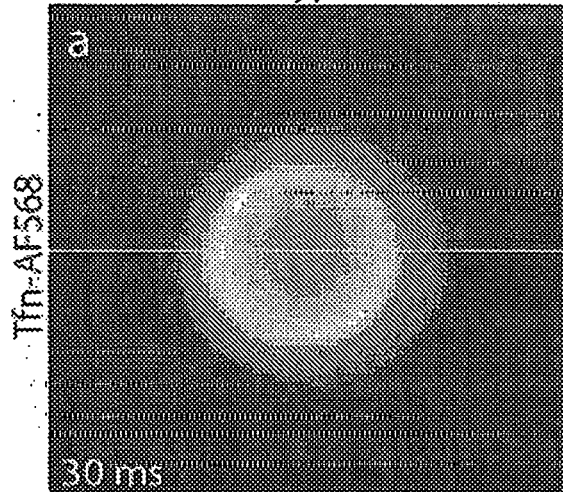


FIG. 8D

Después de la tripsinación

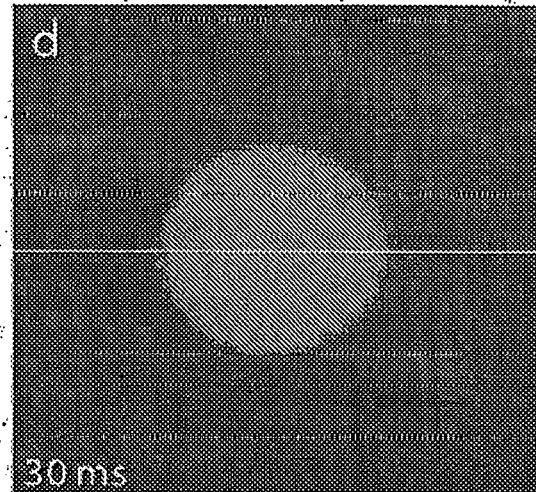


FIG. 8B

Antes de la tripsinación

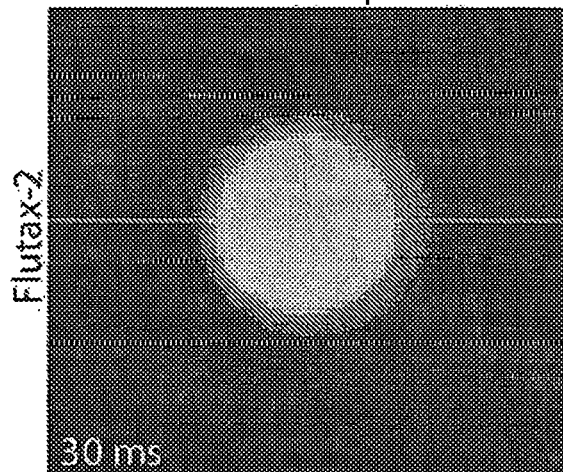


FIG. 8E

Después de la tripsinación

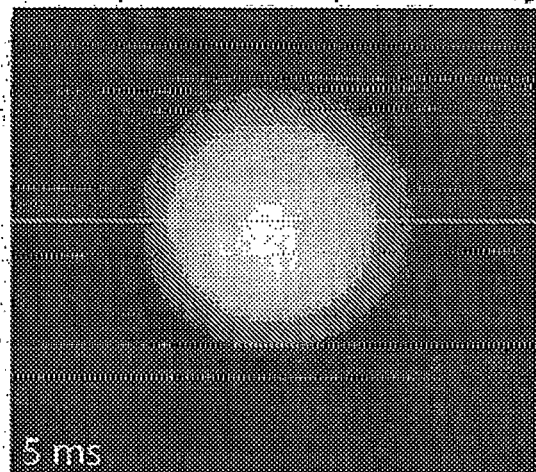


FIG. 8C

Antes de la tripsinación

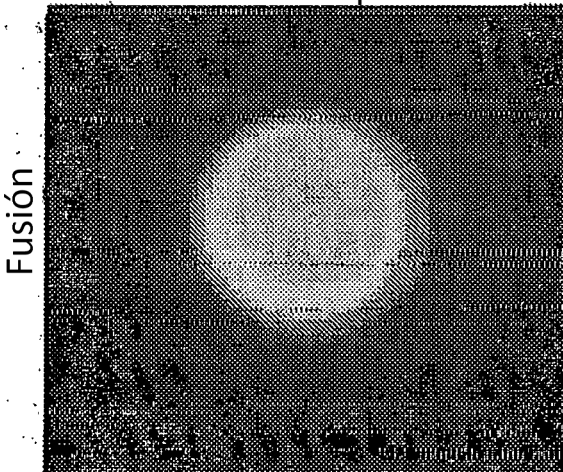


FIG. 8F

Después de la tripsinación

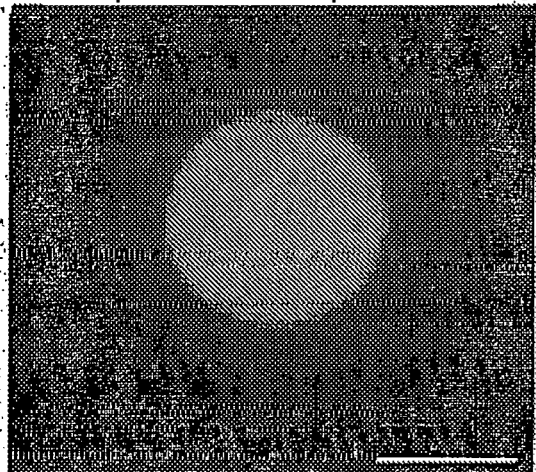


FIG. 8G

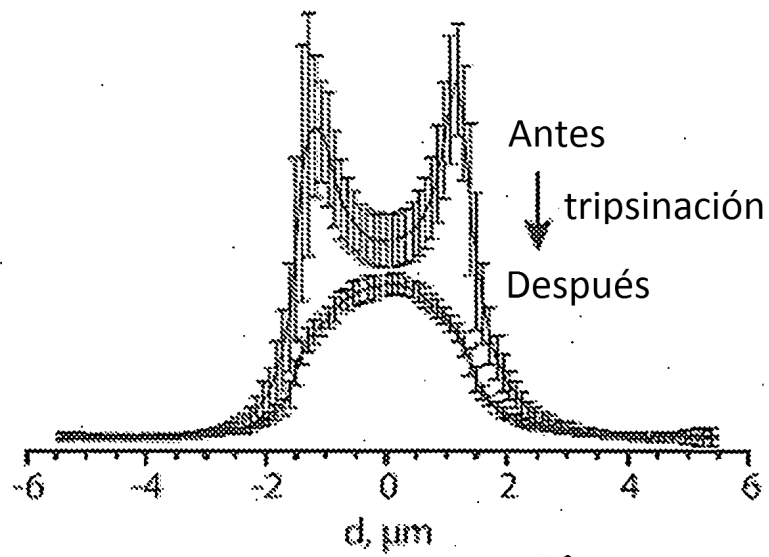


FIG. 8H

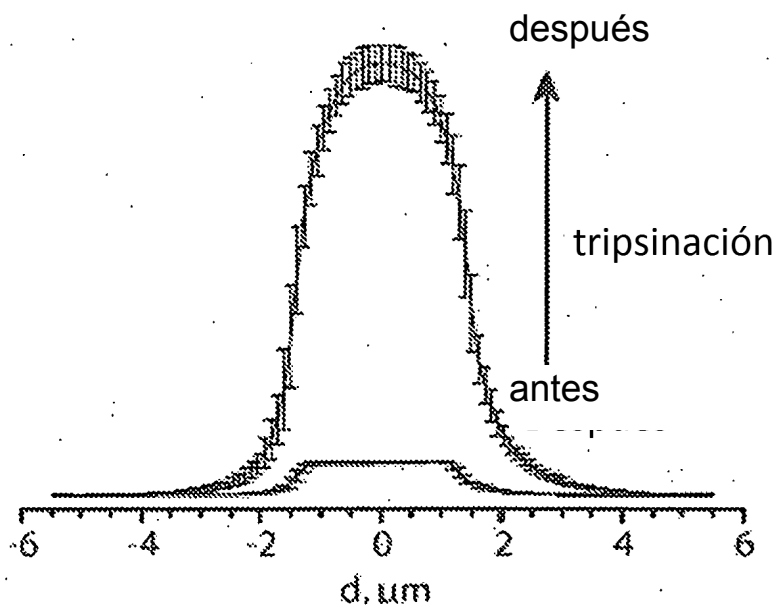
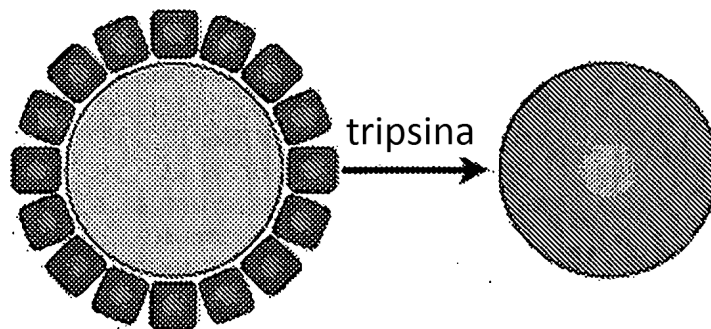


FIG. 8I



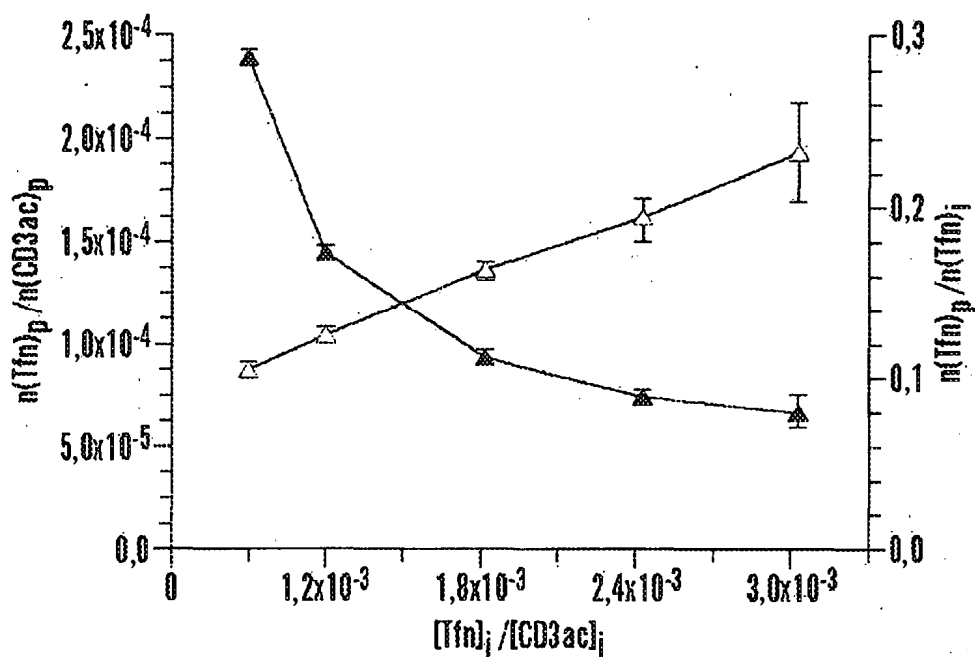


FIG. 9A

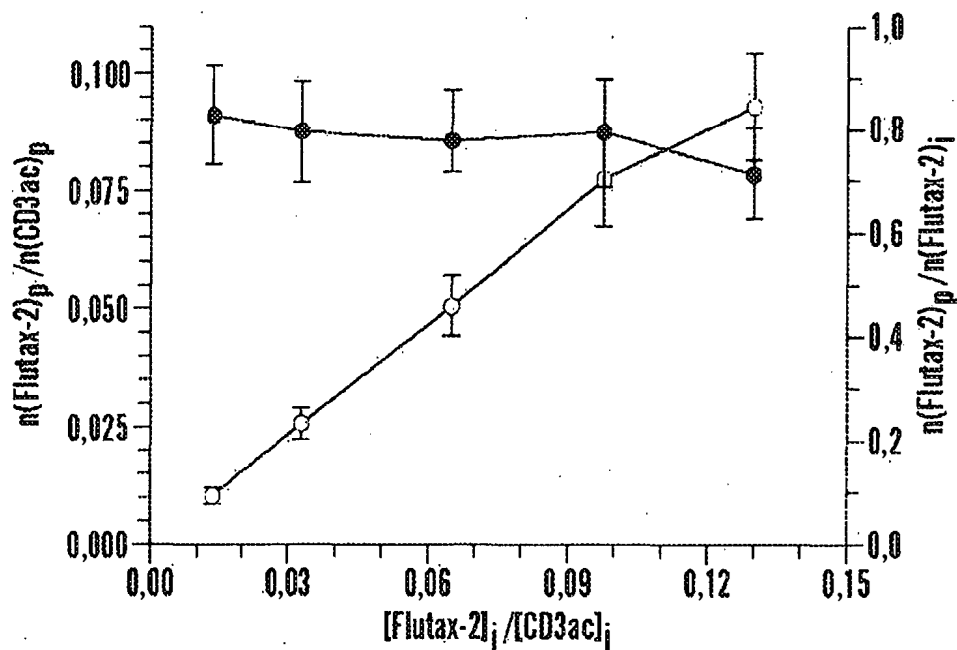


FIG. 9B

FIG. 9C

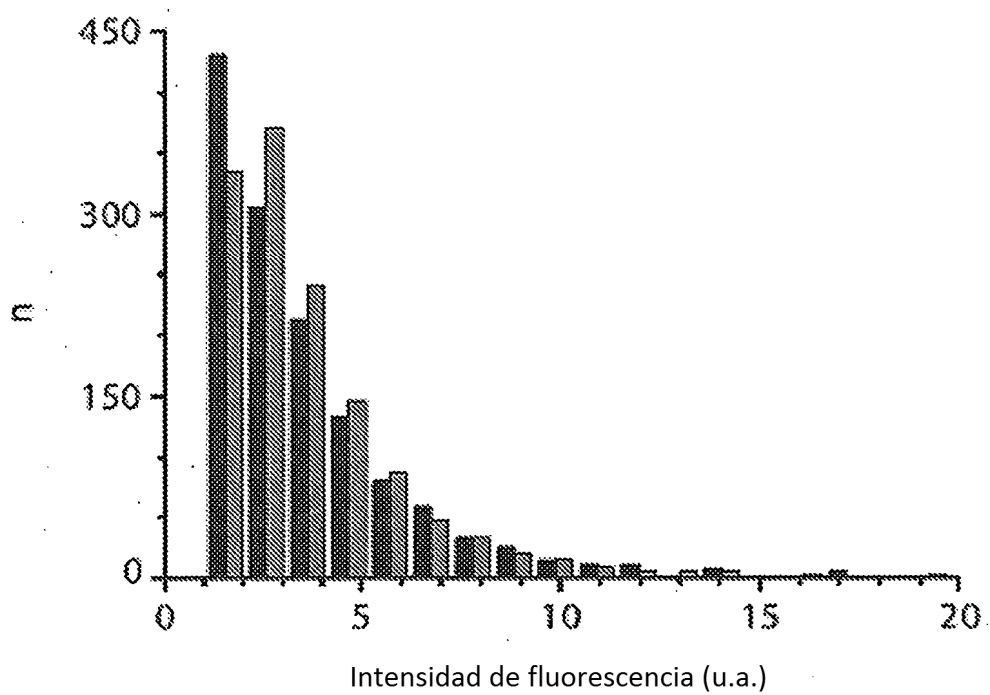
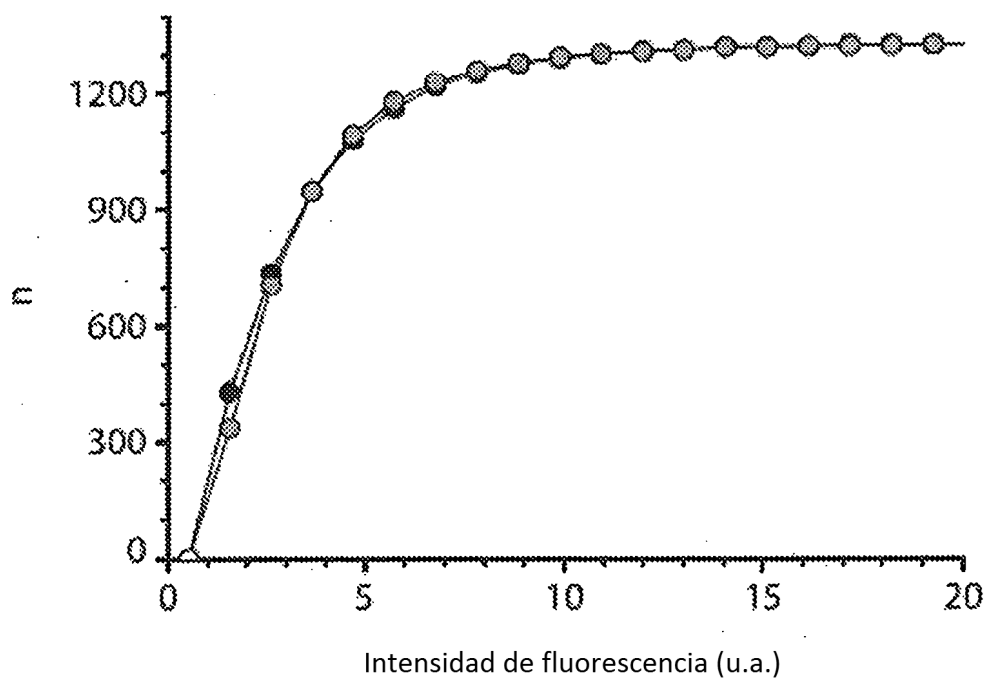


FIG. 9D



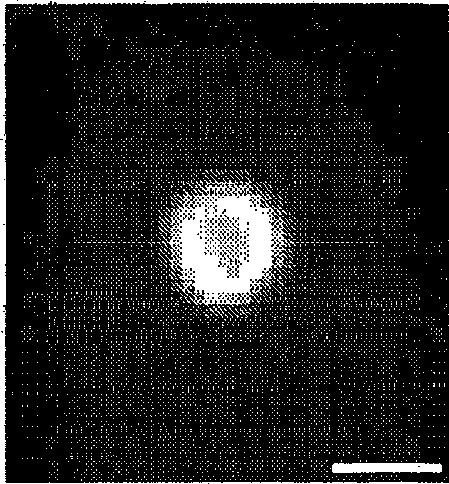


FIG. 10A

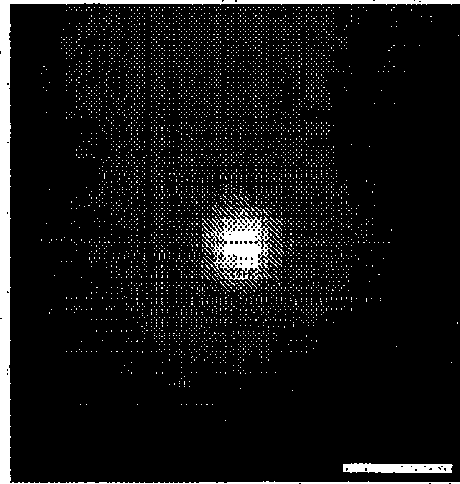


FIG. 10B

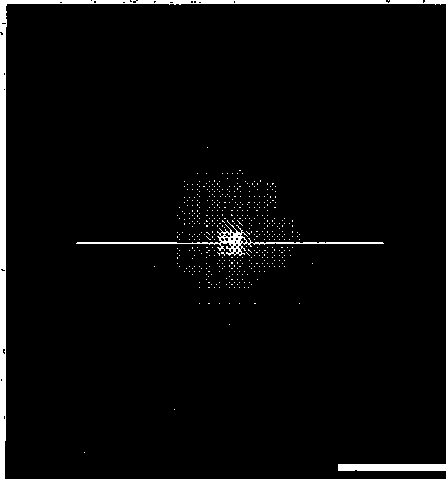


FIG. 10C

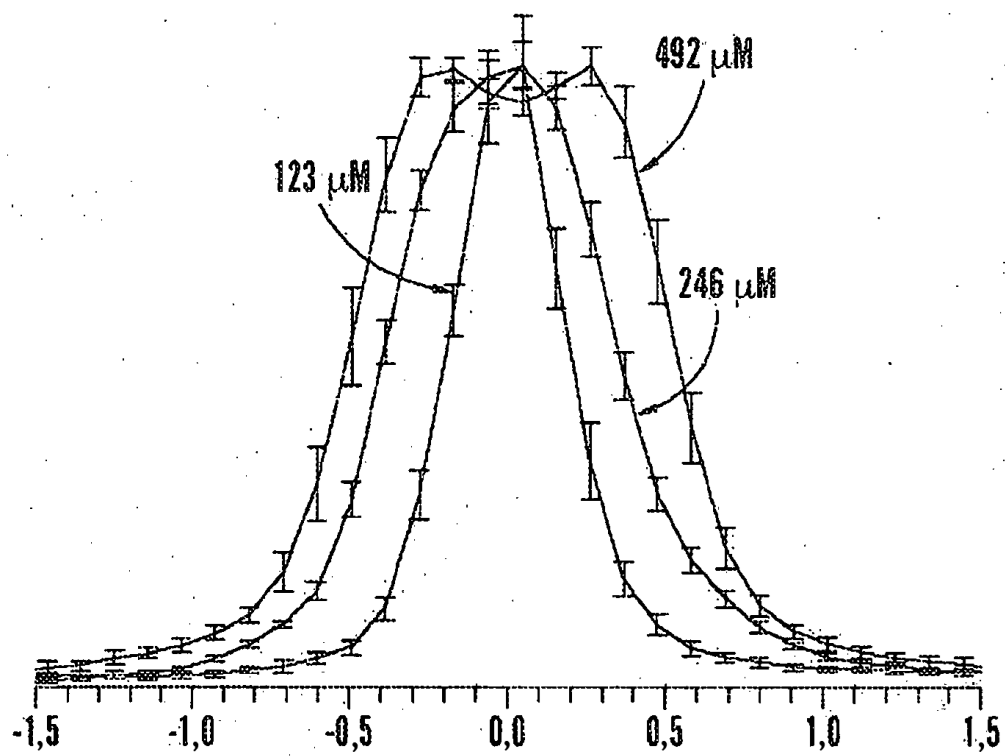


FIG. 10D

FIG. 10E

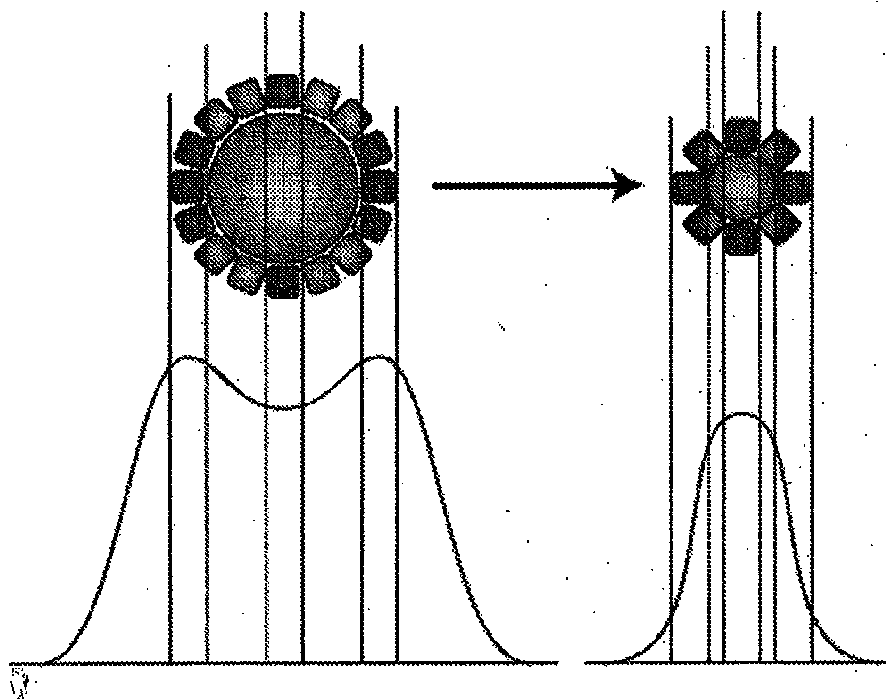


FIG. 10F

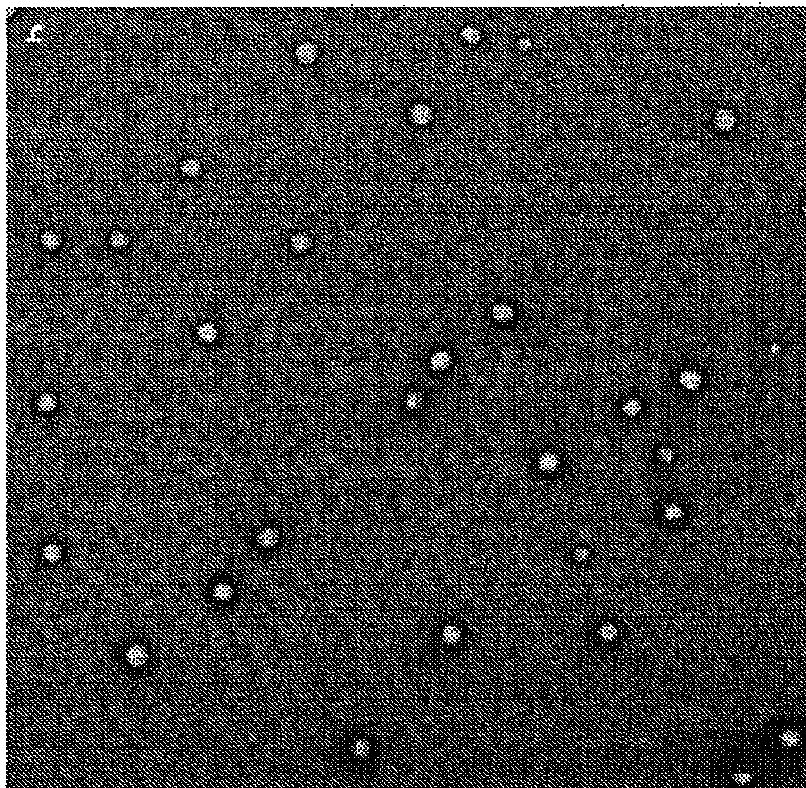


FIG. 10G

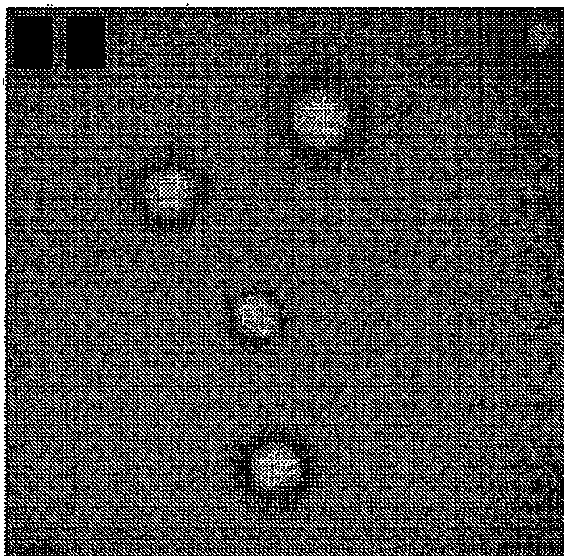


FIG. 10H

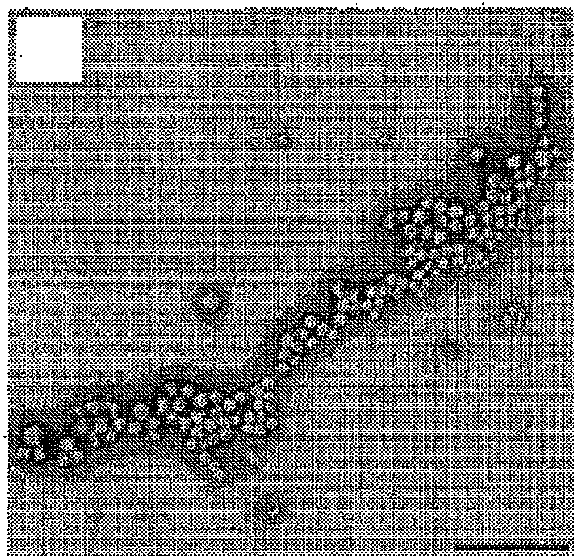
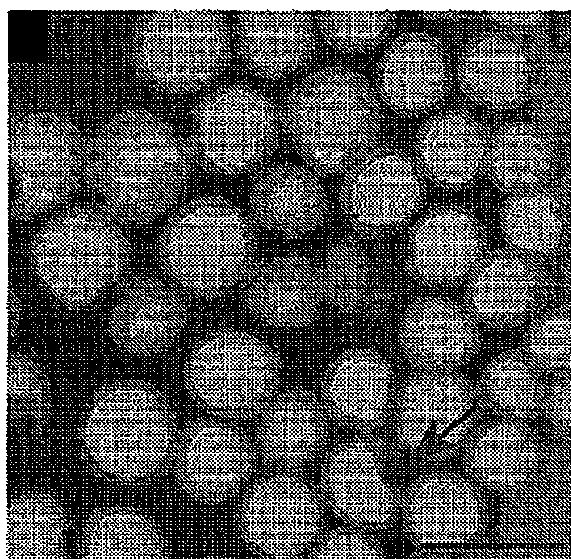


FIG. 10I



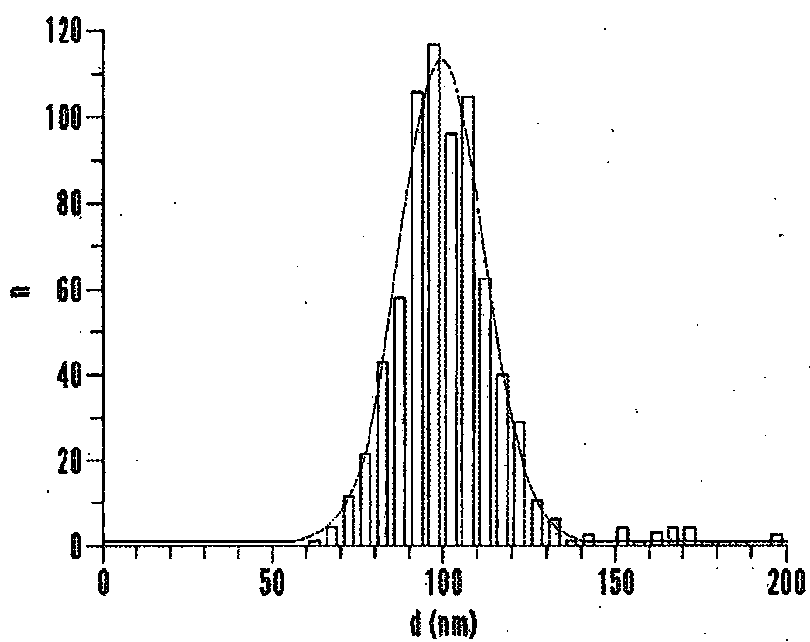


FIG. 10J

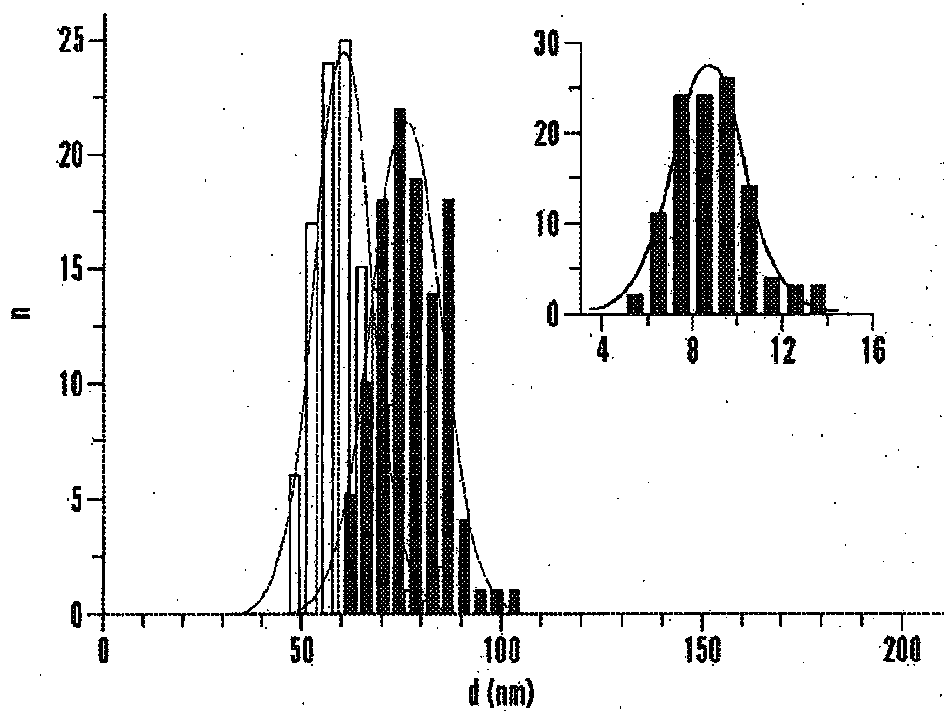
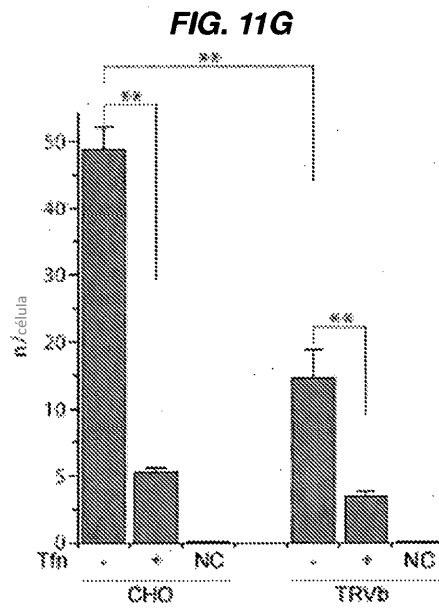
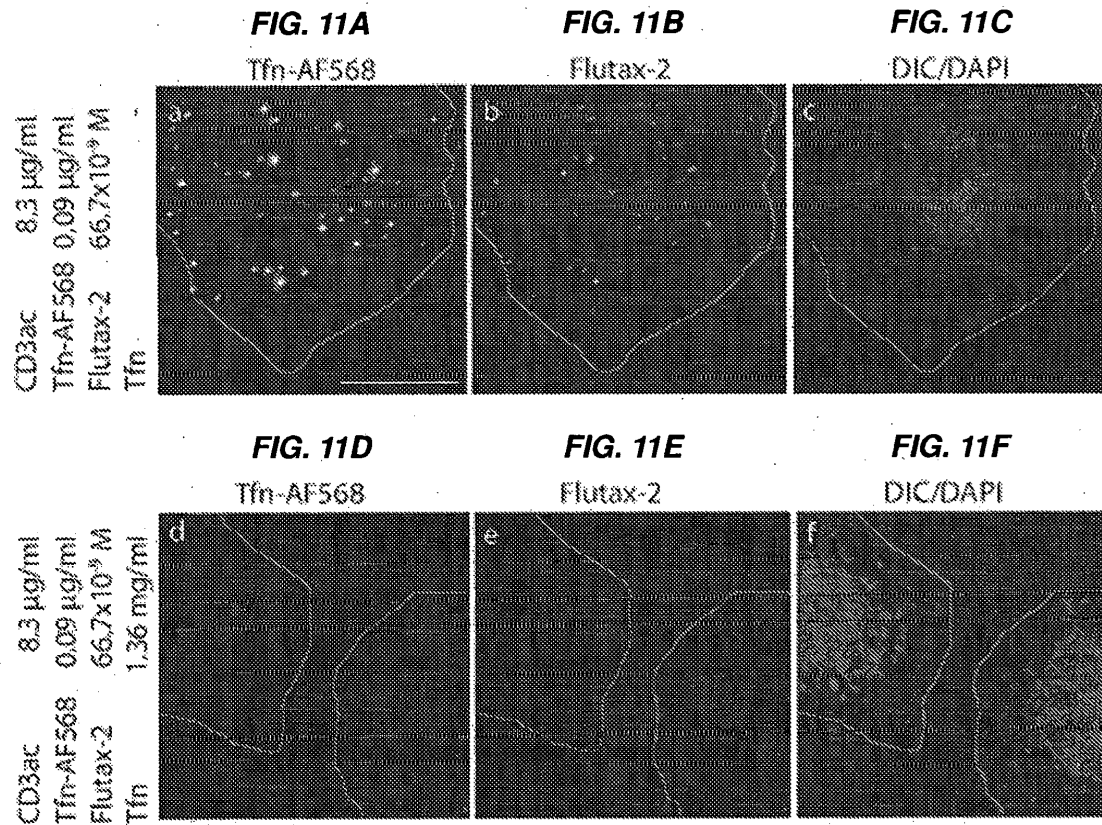


FIG. 10K



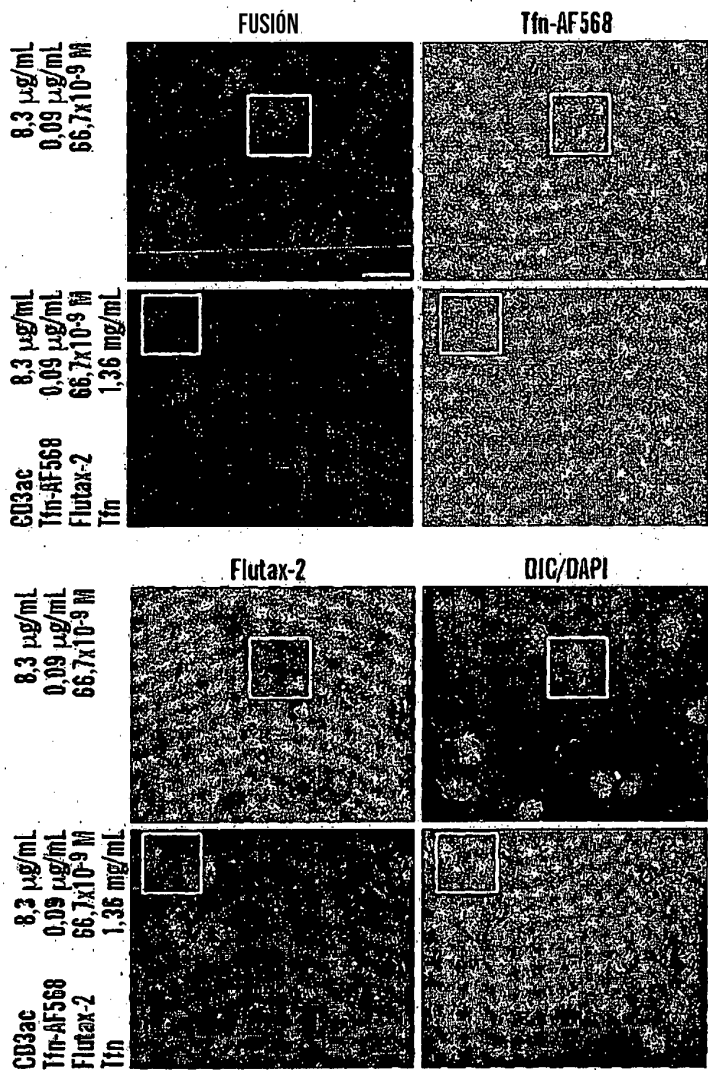


FIG. 11H

FIG. 12A

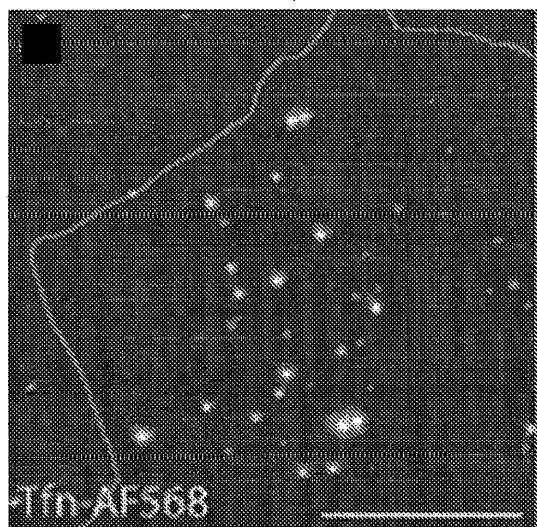


FIG. 12B

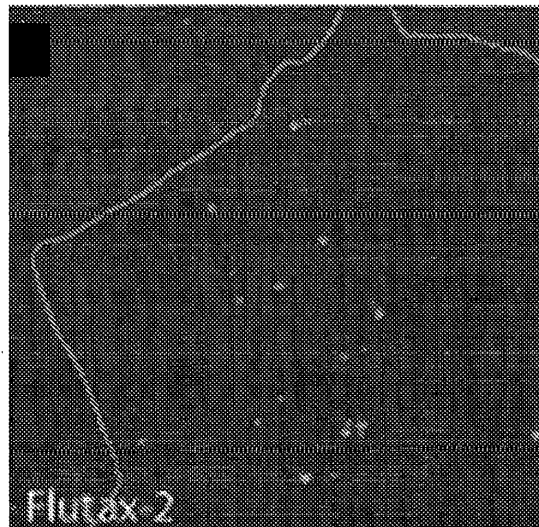


FIG. 12C

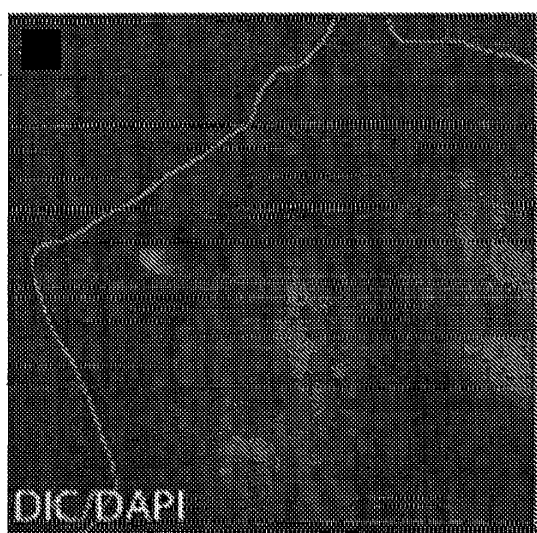
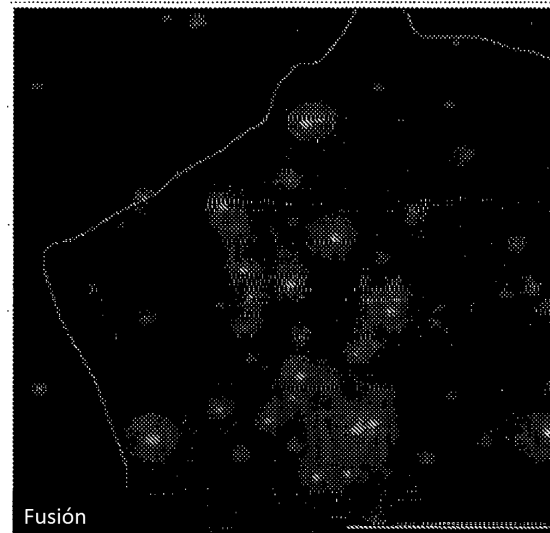


FIG. 12D



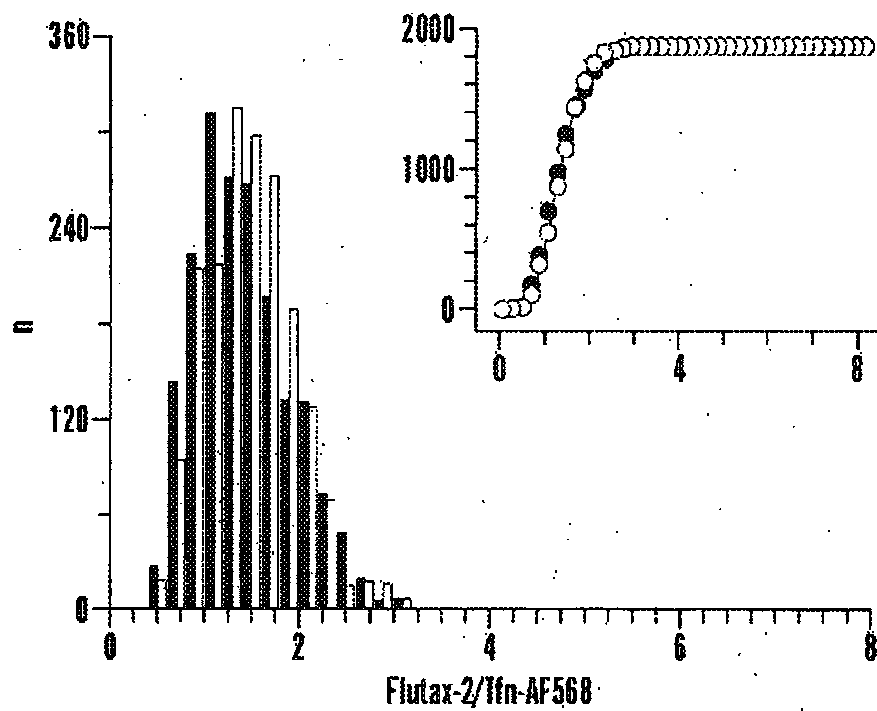


FIG. 12E

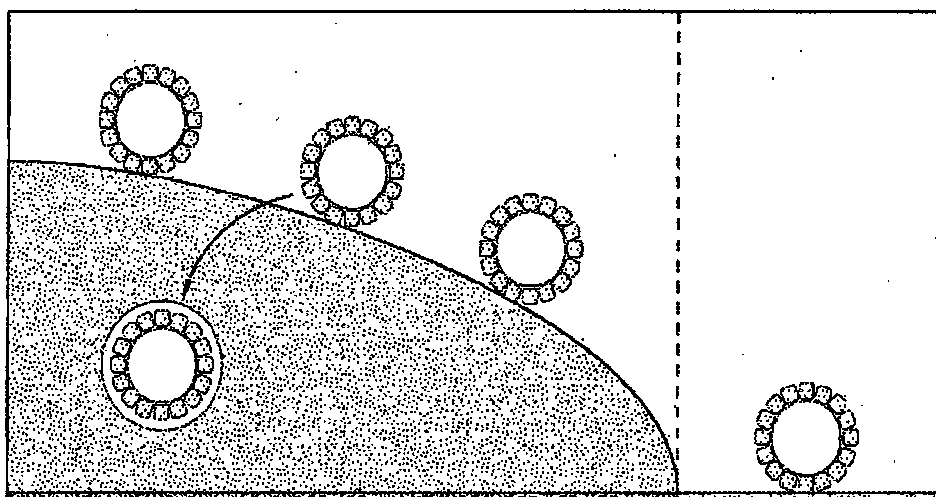


FIG. 12F

FIG. 12G

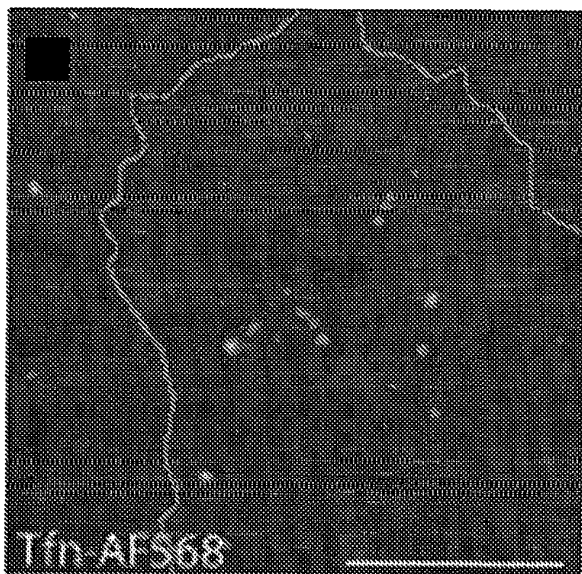


FIG. 12H

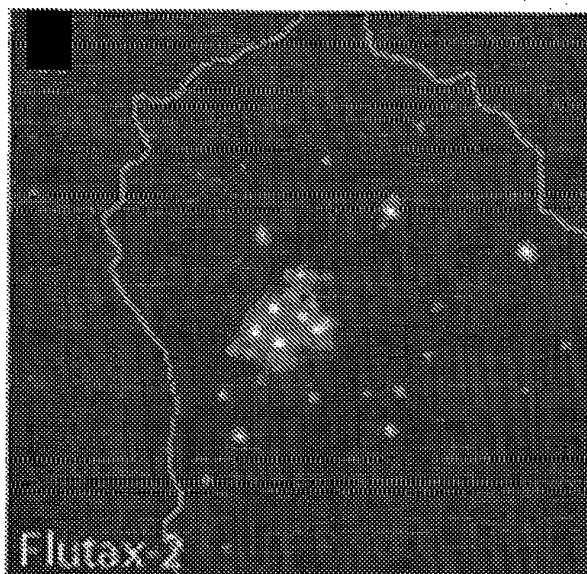


FIG. 12I

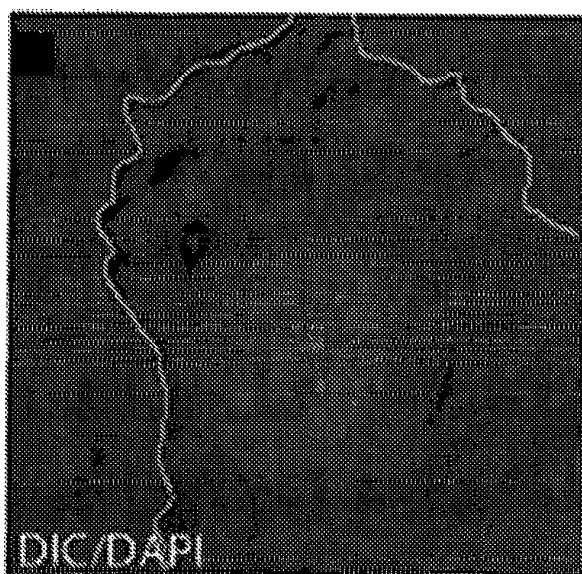
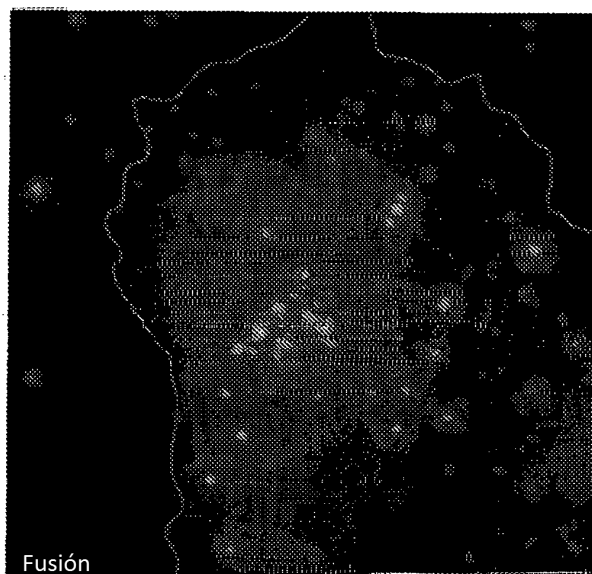


FIG. 12J



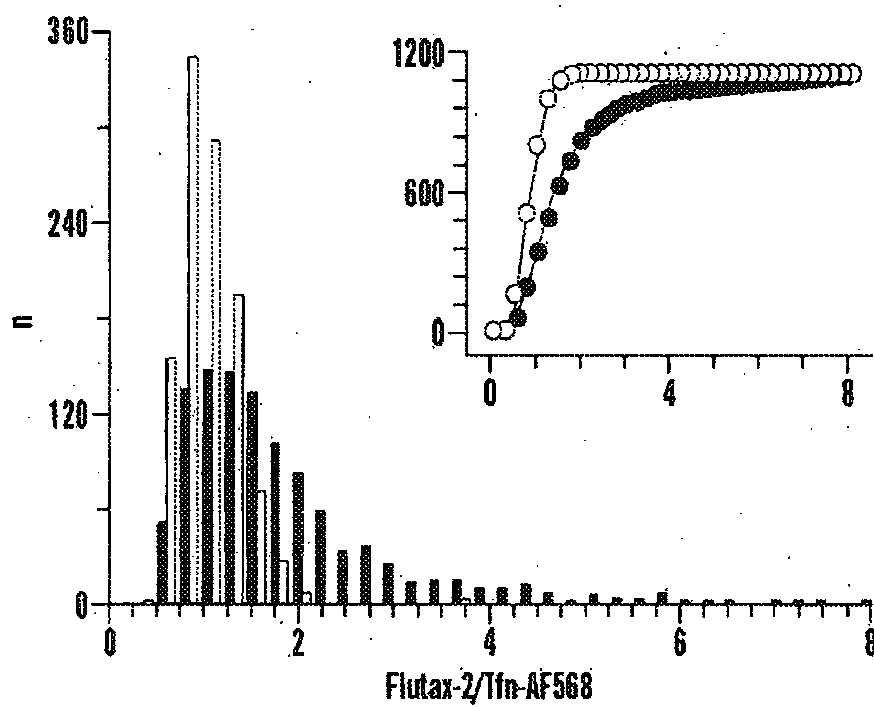


FIG. 12K

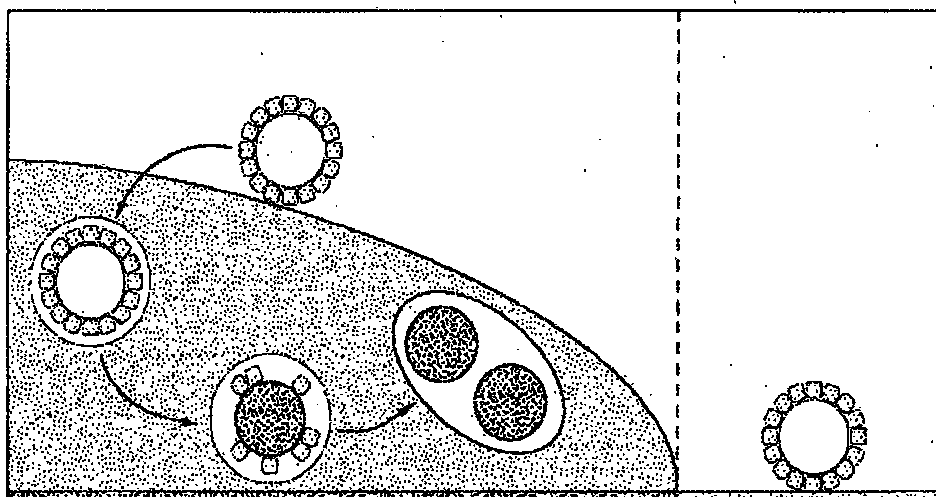
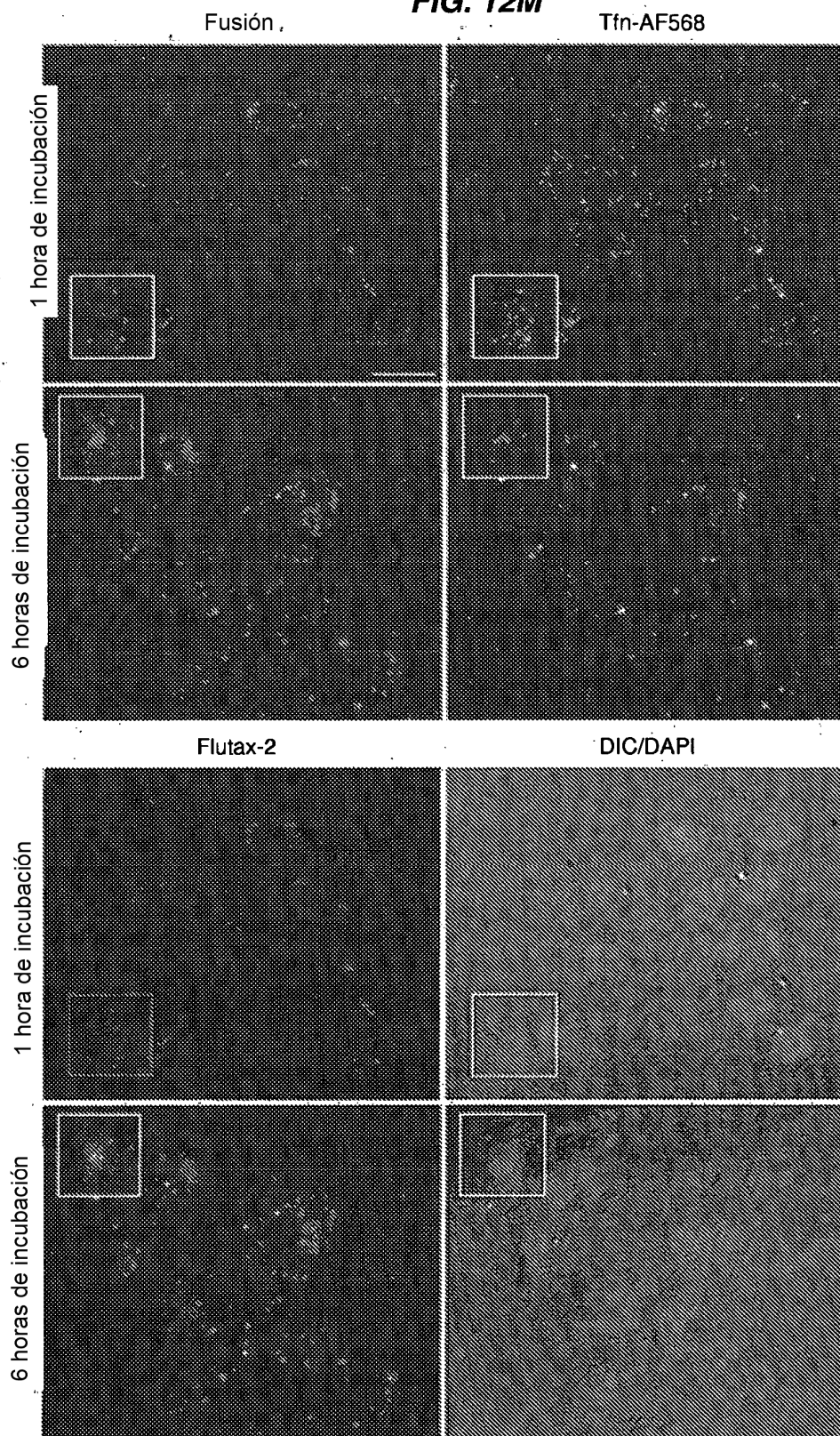


FIG. 12L

FIG. 12M



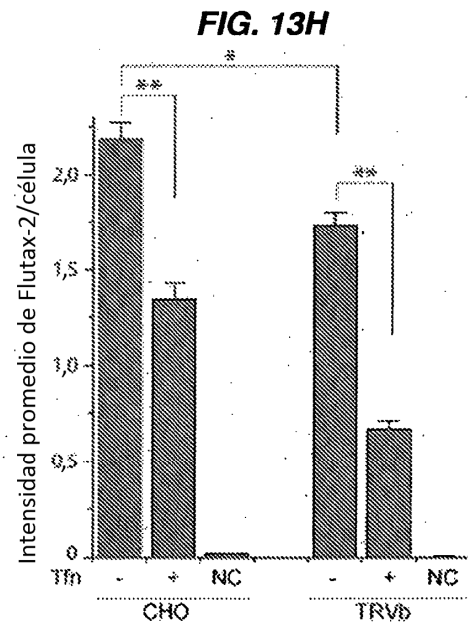
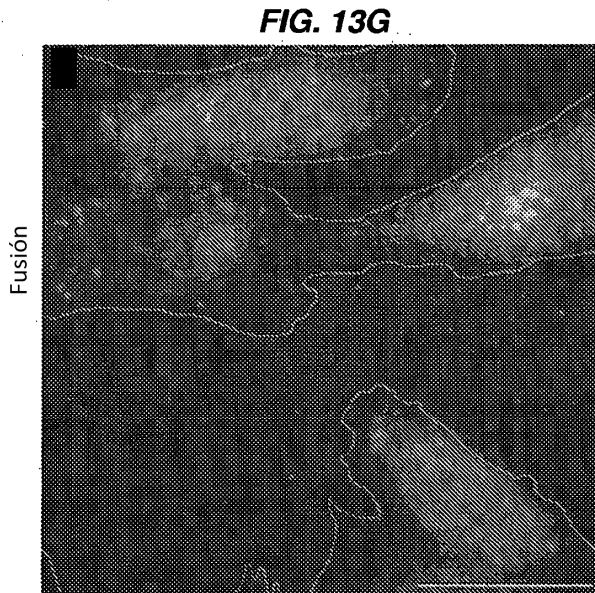
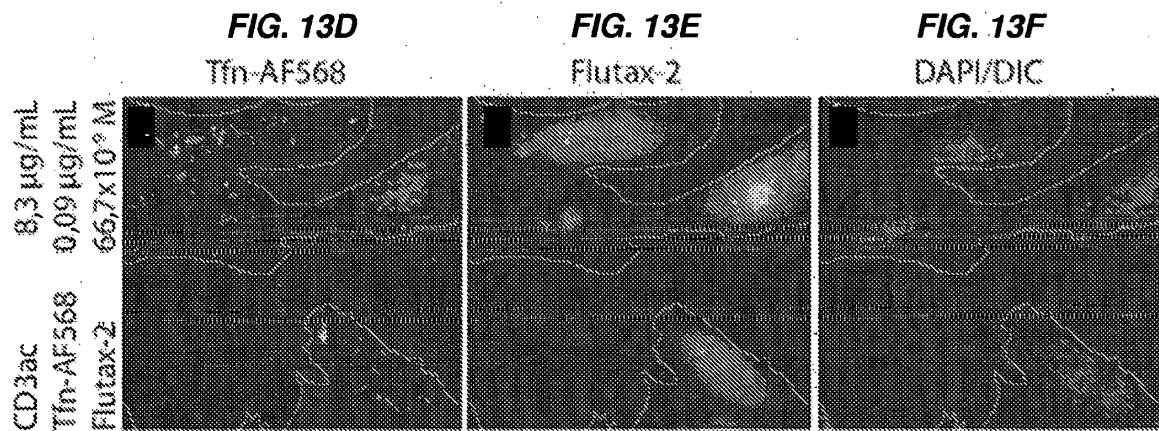
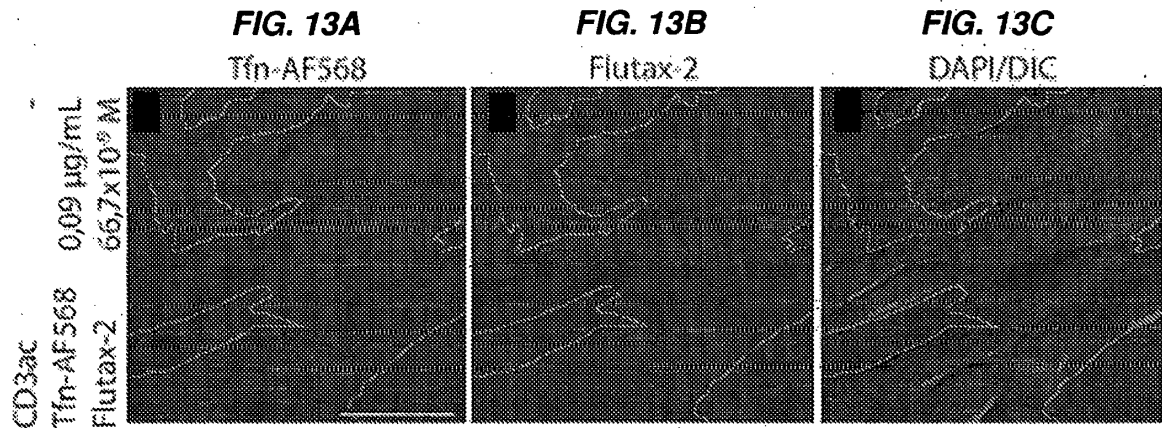


FIG. 13I

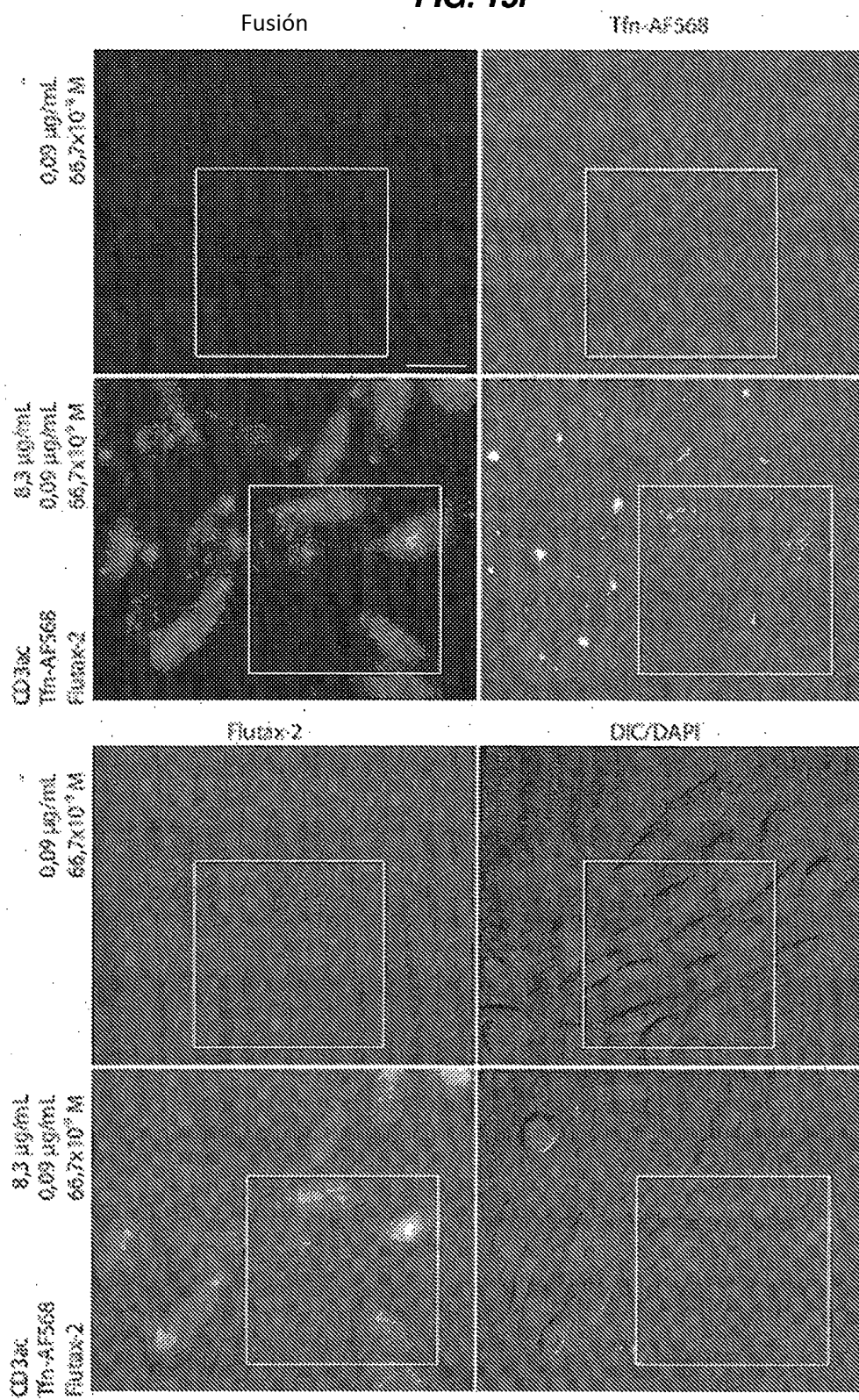
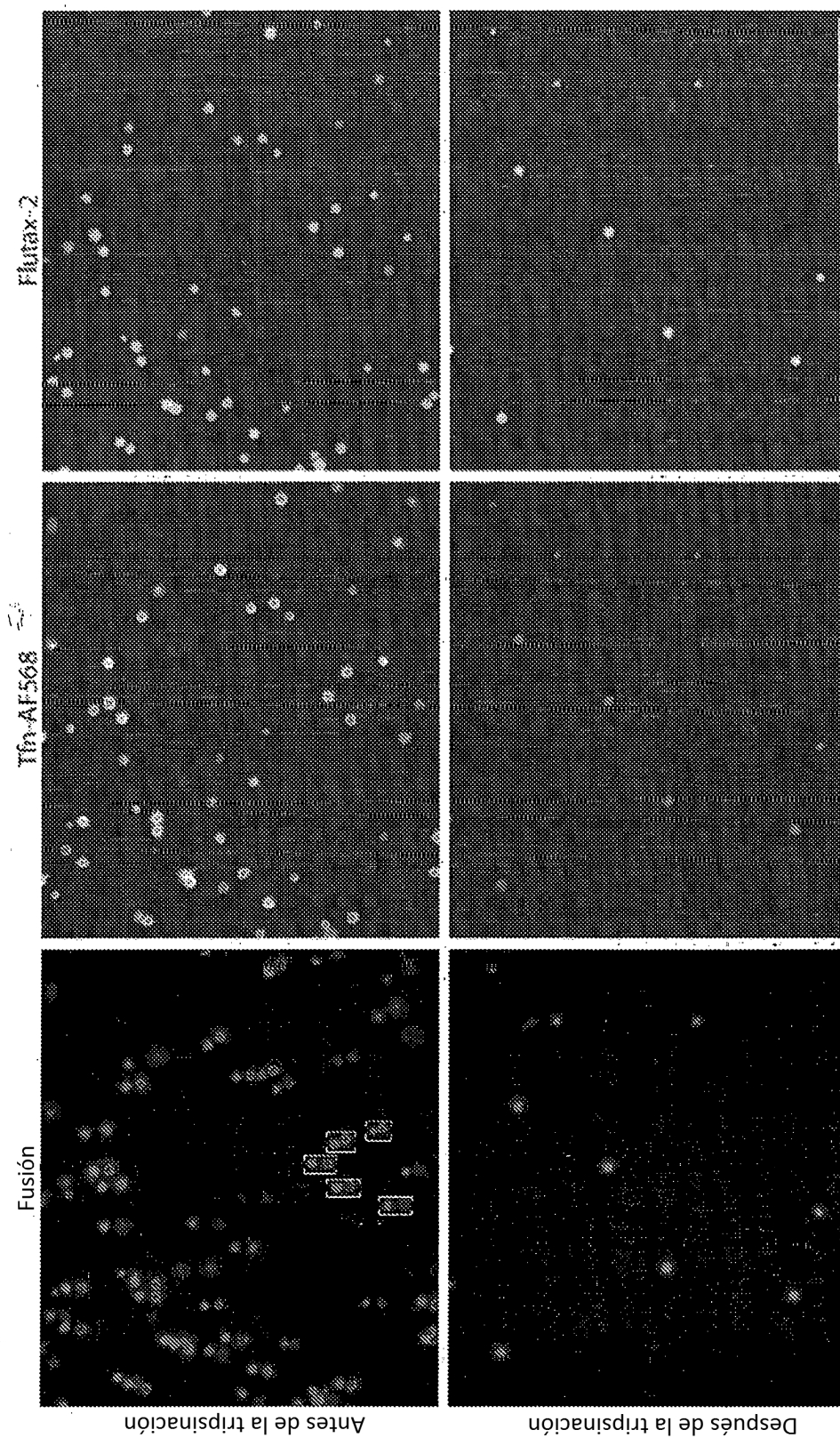


FIG. 14



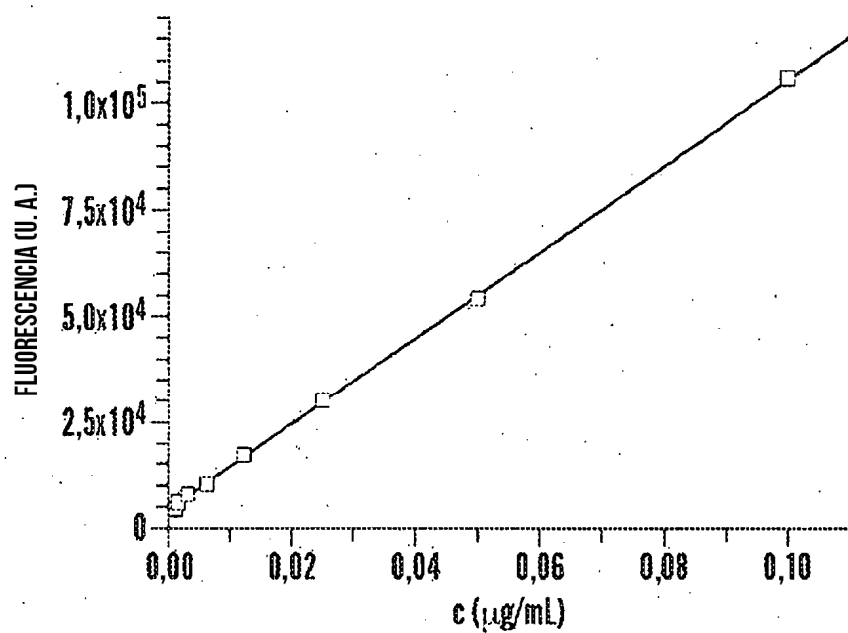


FIG. 15A

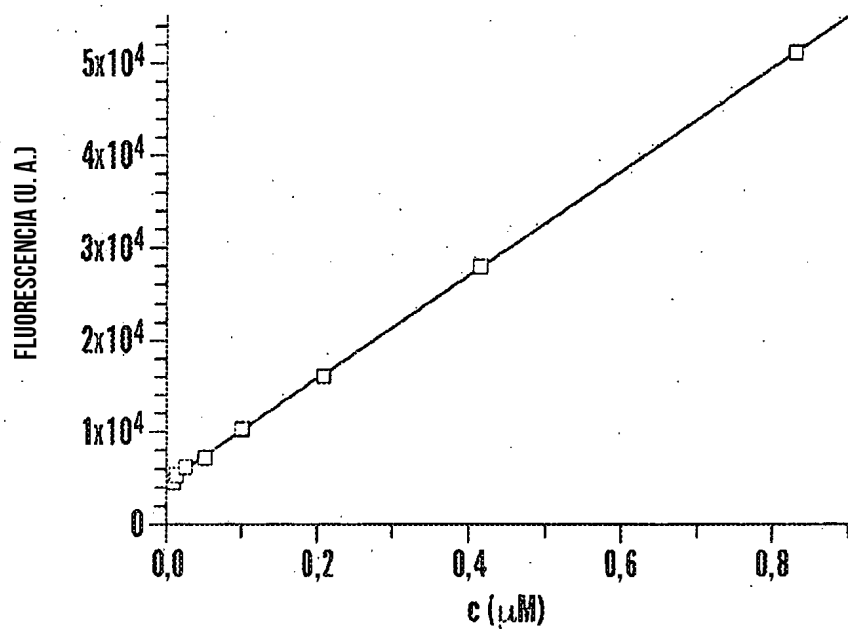


FIG. 15B

FIG. 16A

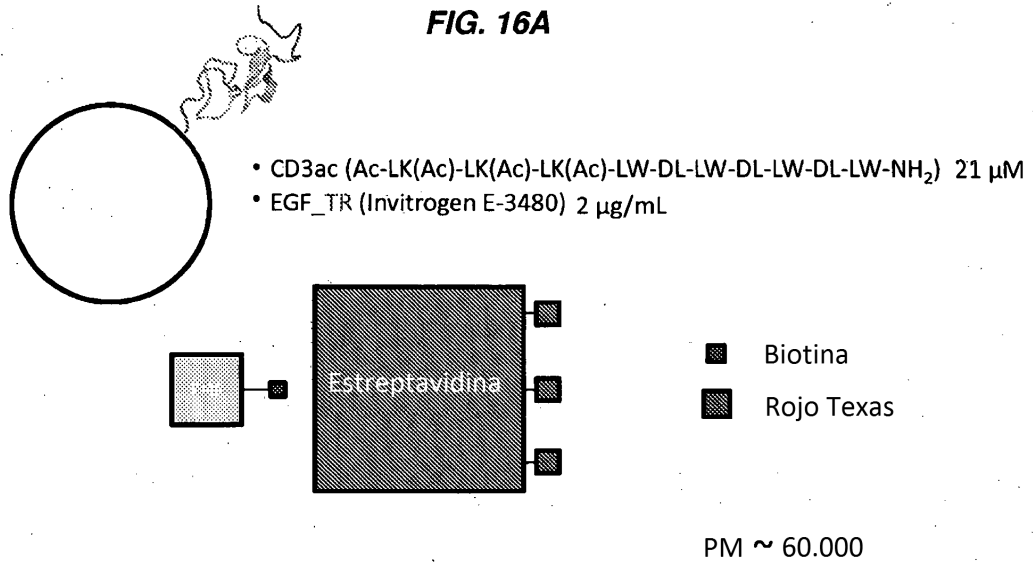


FIG. 16B

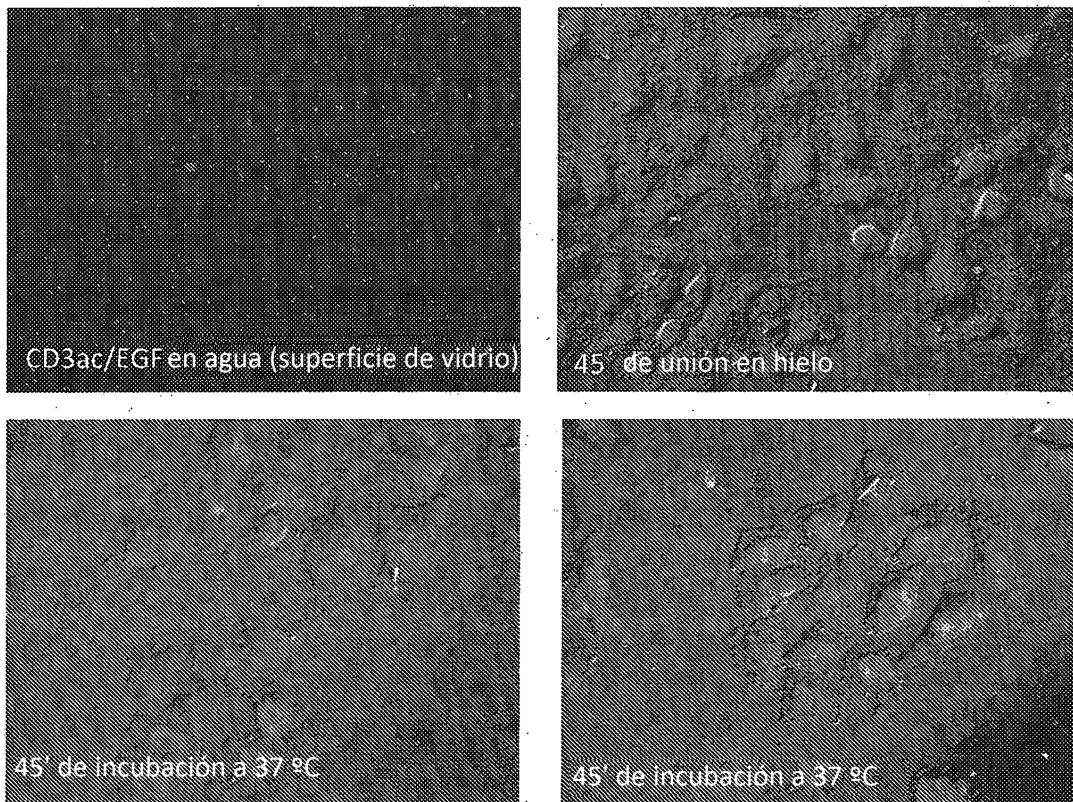
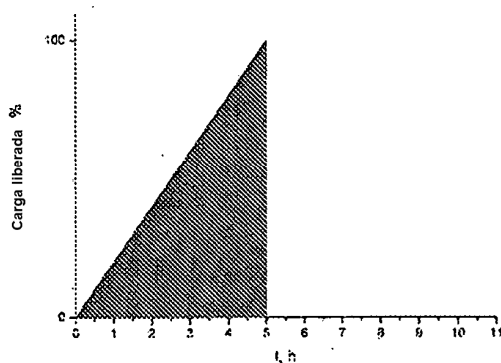


FIG. 17A

PB1e

- CD3ac (Ac-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH₂) 21 μ M
- EGF 2 μ g/ml marcado con Rojo Texas (EGF_TR)
- Nocodazol 20 μ M
- DMEM/PBS

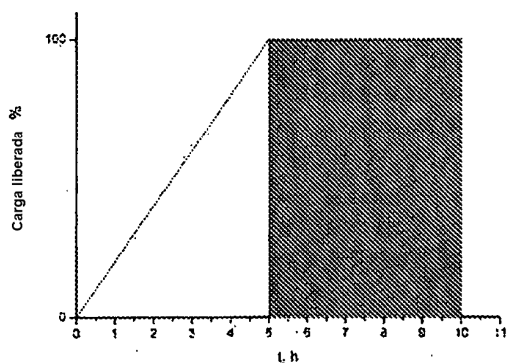


Control negativo (CN)

- DMEM/PBS

Sobrenadante de PB1e control (PB1e_sup)

- CD3ac (Ac-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH₂) 21 μ M
- EGF_TR 2 μ g/ml
- Nocodazol 20 μ M
- DMEM/PBS
- Incubar durante 5h a 37 °C
- Centrifugar a 16.000 a, 30 min
- Aplicar sobrenadante a las células



Nocodazol (NOC)

- Nocodazol 20 μ M
- DMEM/PBS

FIG. 17B

1 h de incubación a 37 °C

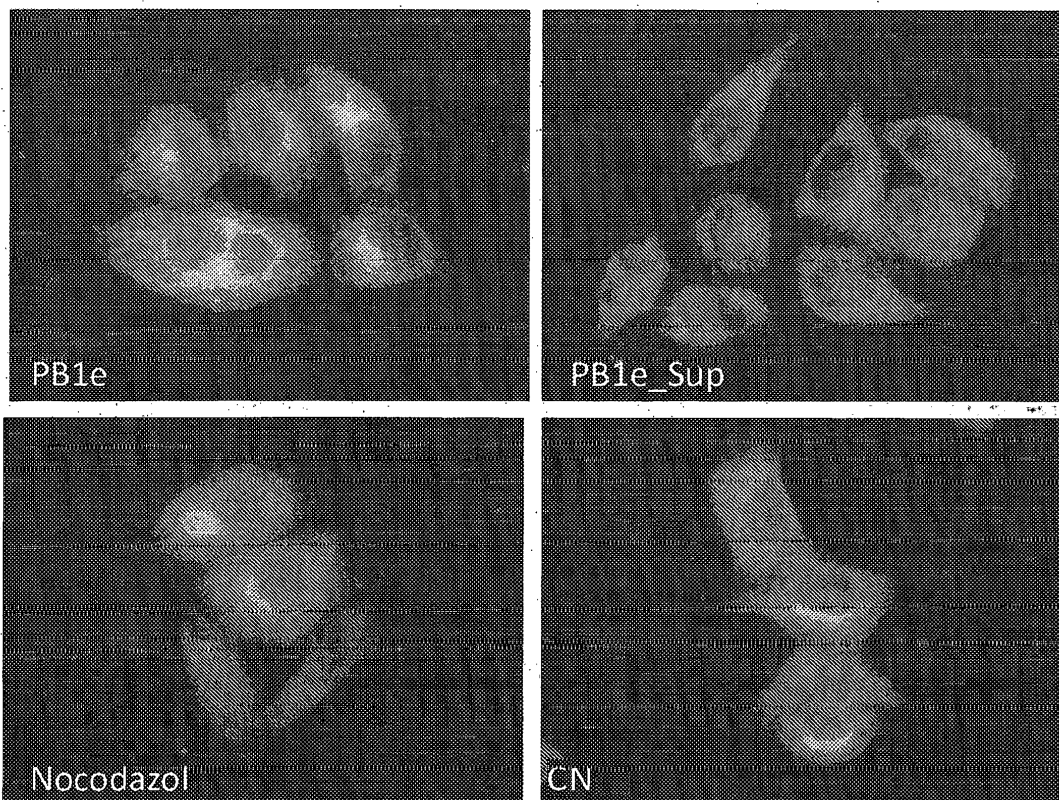


FIG. 17C

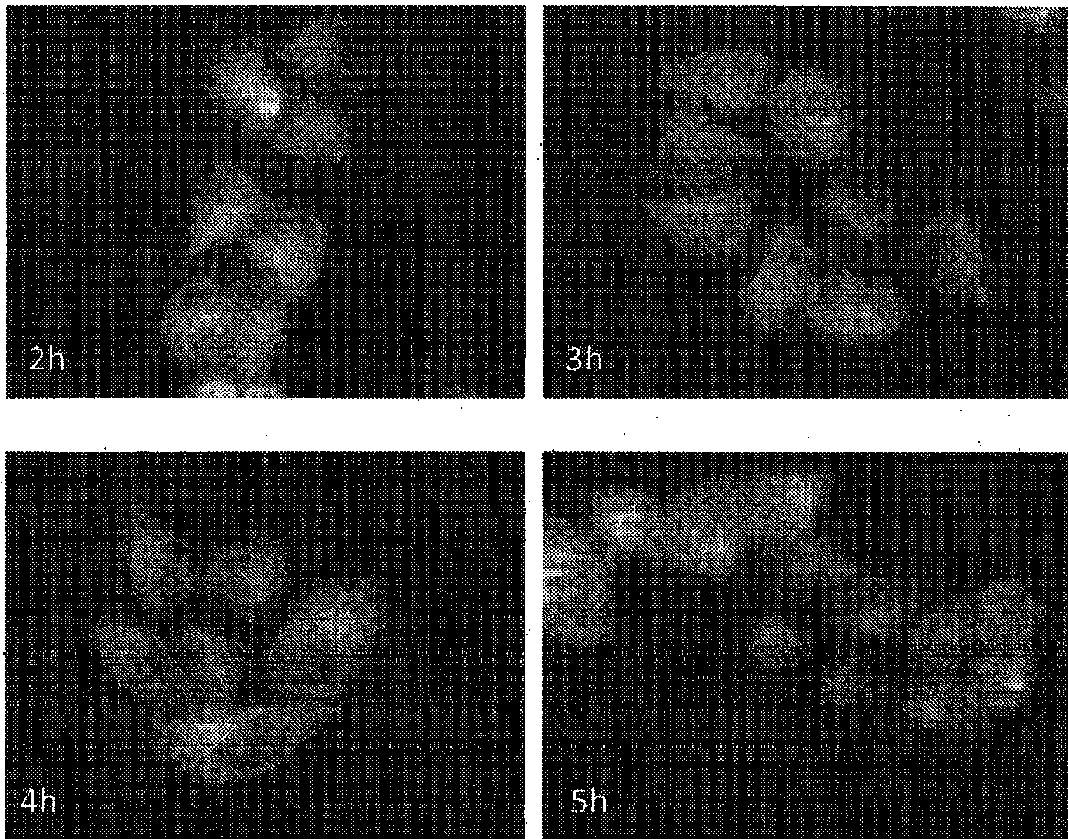


FIG. 17D

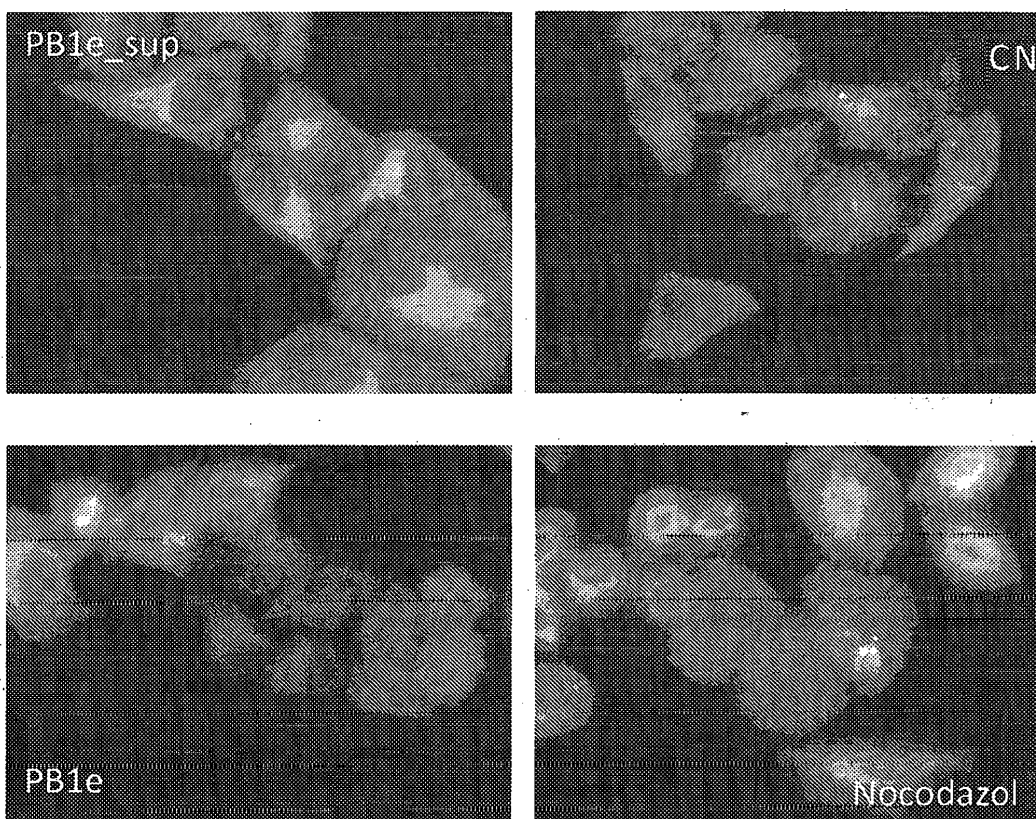


FIG. 17E

PB1e

PB1e_sup

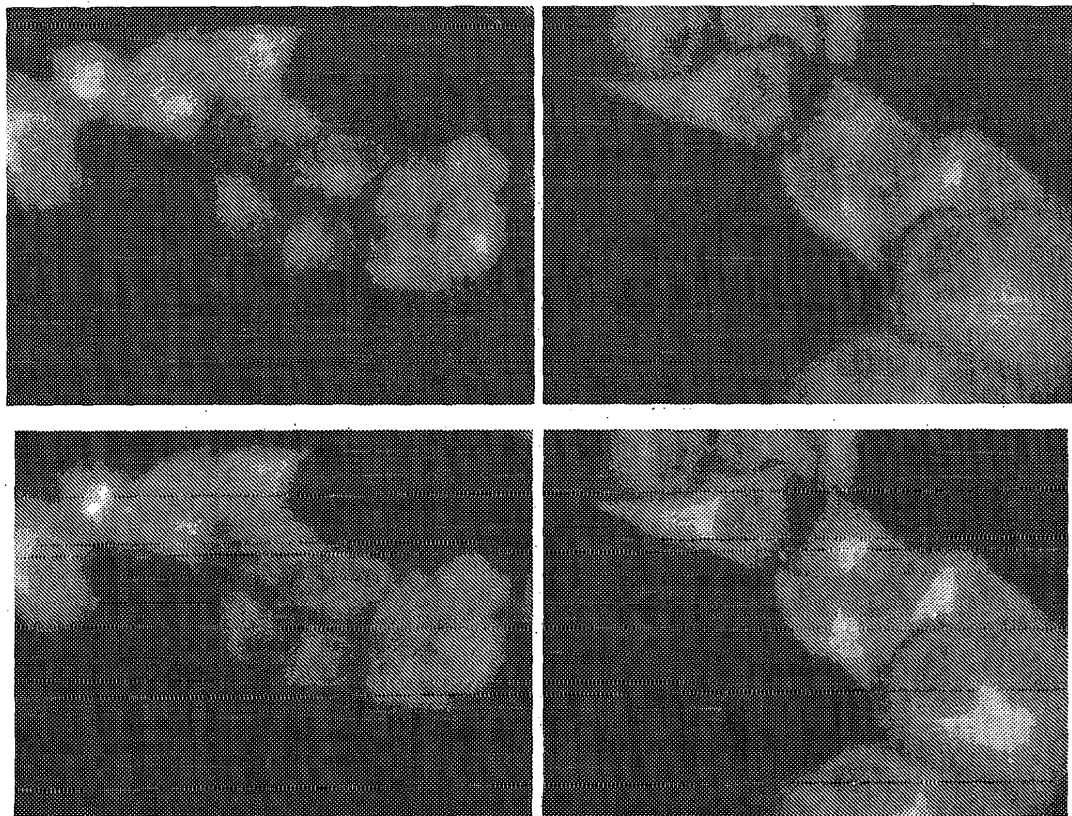
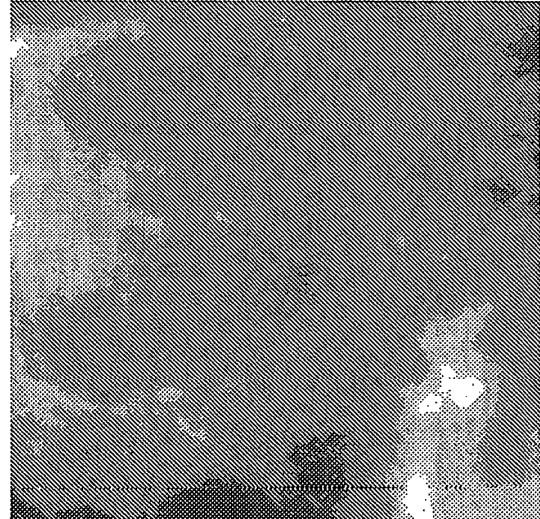


FIG. 17F

PB1e_sup



CN



PB1e



Nocodazol

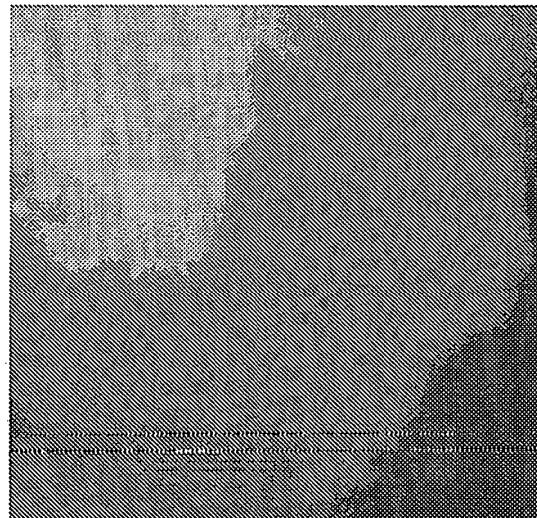
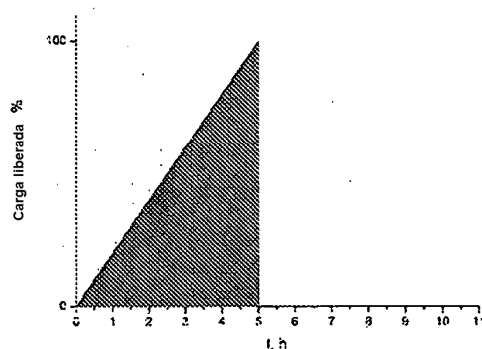


FIG. 17G

PB1e

- CD3ac (Ac-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH₂) 21 μ M
- EGF 2 ug/ml marcado con Rojo Texas (EGF_TR)
- Nocodazol 40 uM
- DMEM/PBS



Control negativo (CN)

- DMEM/PBS

Sobrenadante de PB1e control (PB1e_sup)

- CD3ac (Ac-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH₂) 21 μ M
- EGF_TR 2 μ g/ml
- Nocodazol 40 uM
- DMEM/PBS
- Incubar durante 5h a 37 °C
- Centrifugar a 16.000 a, 30 min
- Aplicar sobrenadante a las células

Nocodazol (NOC)

- Nocodazol 40 uM
- DMEM/PBS

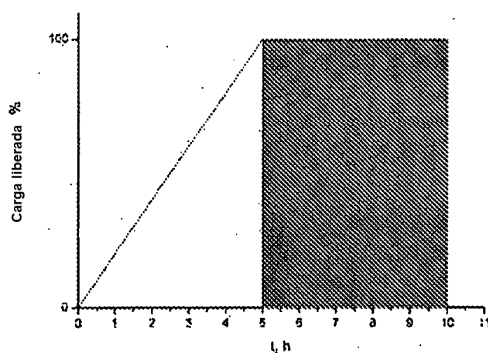
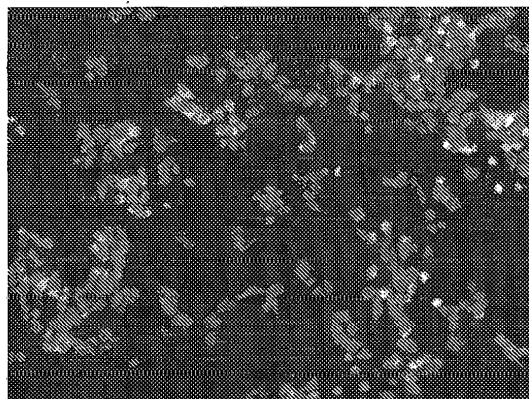


FIG. 17H

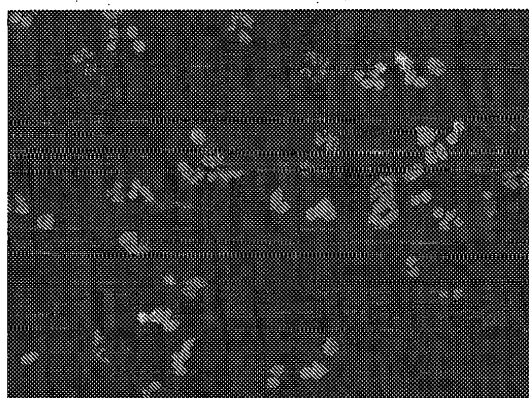
4 h de incubación a 37 °C, 10x



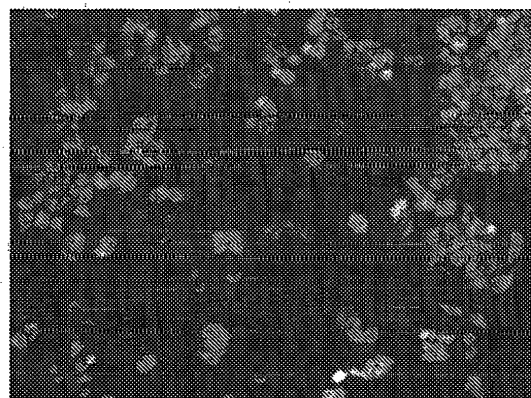
PB1e



PB1e_sup



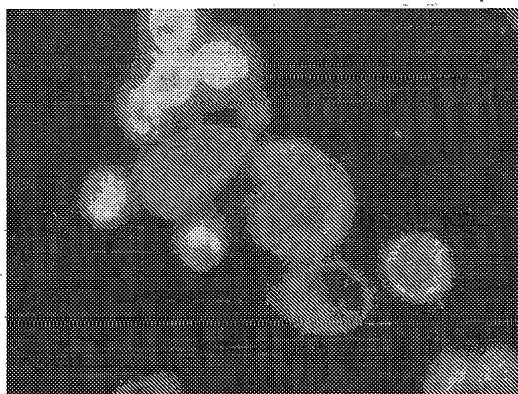
Nocodazol



CN

FIG. 17I

4 h de incubación a 37 °C, 60x



PB1e



PB1e_sup



Nocodazol



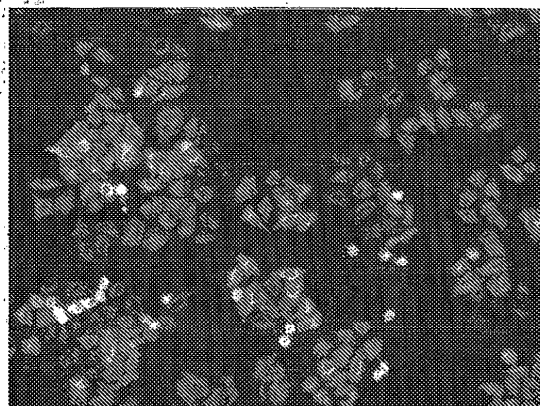
CN

FIG. 17J

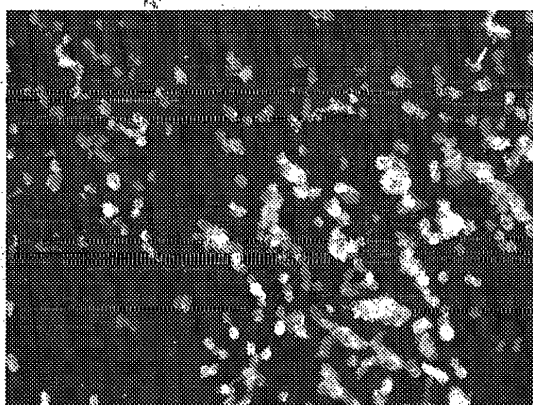
24 h de incubación a 37 °C, 10x



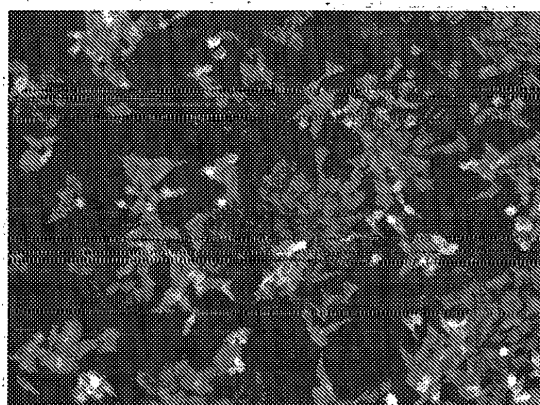
PB1e



PB1e_sup



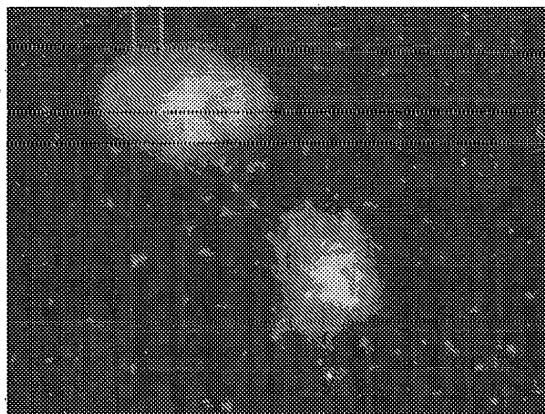
Nocodazol



CN

FIG. 17K

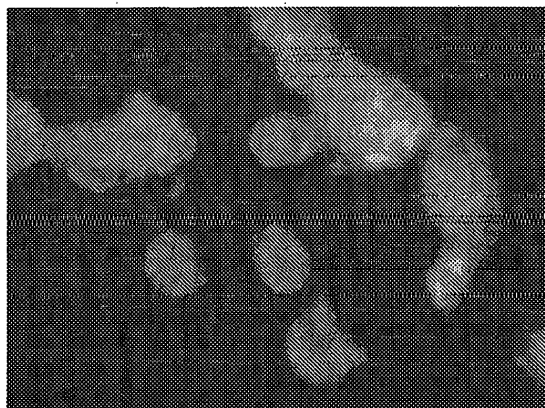
24 h de incubación a 37 °C, 60x



PB1e



PB1e_sup



Nocodazol



CN

FIG. 18A

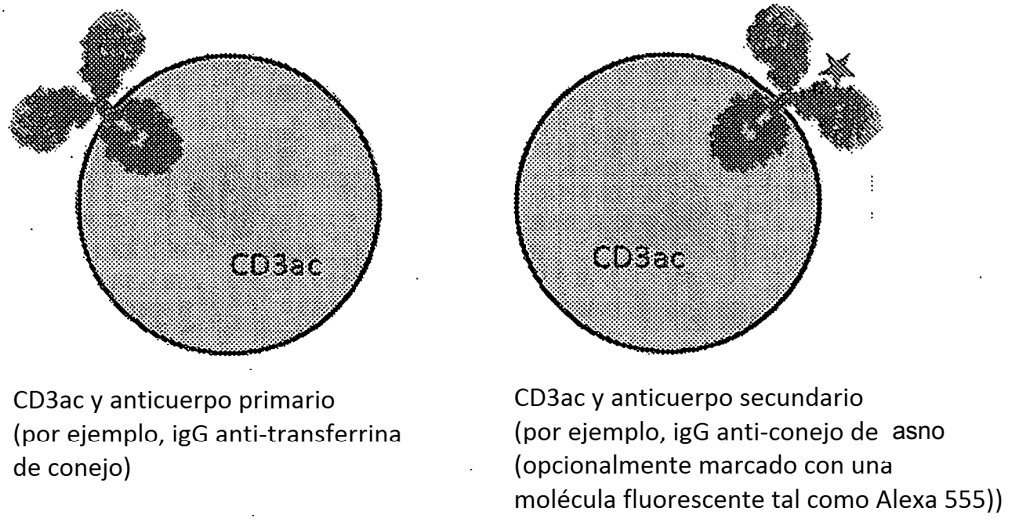


FIG. 18B

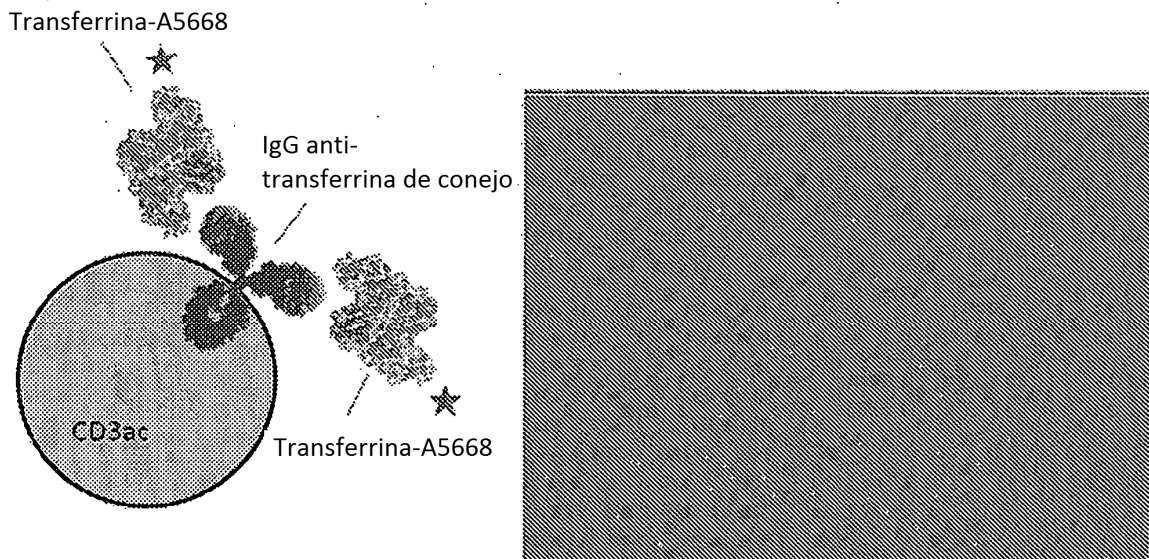


FIG. 18C

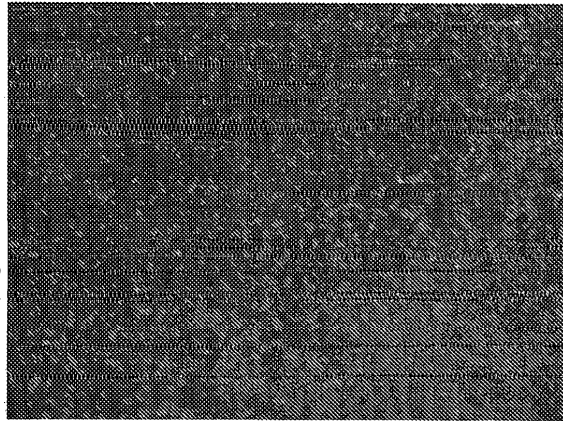
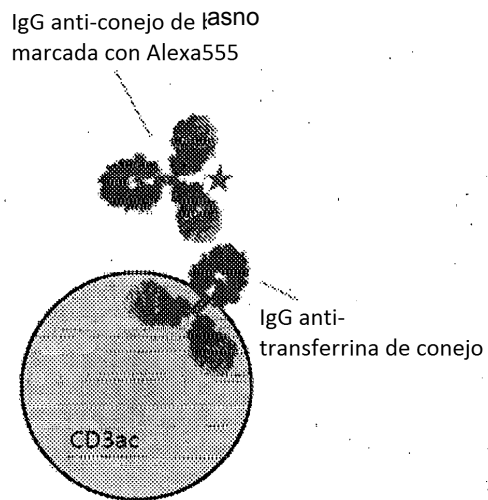
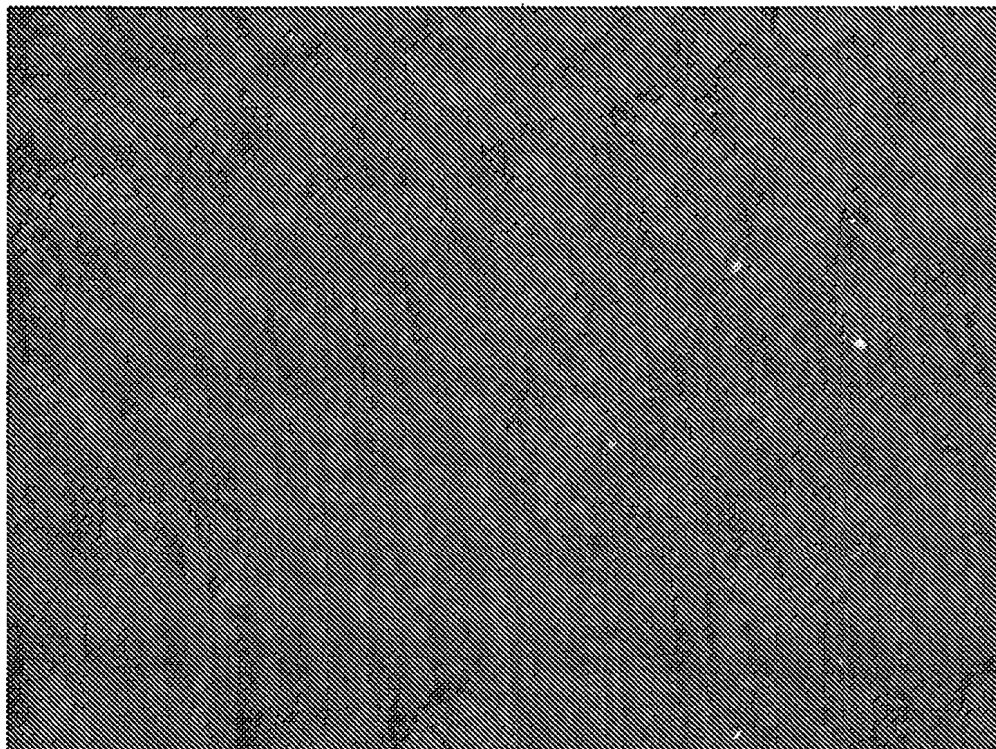


FIG. 19A



- CD3 (H-LK-LK-LK-LW-DL-LW-DL-LW-NH₂)⁴⁺ 21 μM
- (5'-TTGTGCCGCCTTTGCAGGTGTATC-3')²⁴⁻ 5,4 μM
- (AF₄₈₈-5'-TTGTGCCGCCTTTGCAGGTGTATC-3')²⁴⁻ 0,24 μM

FIG. 19B



- (5'-TTGTGCCGCCTTTGCAGGTGTATC-3')²⁴ 5,4 μM
- (AF₄₈₈-5'-TTGTGCCGCCTTTGCAGGTGTATC-3')²⁴ 0,24 μM

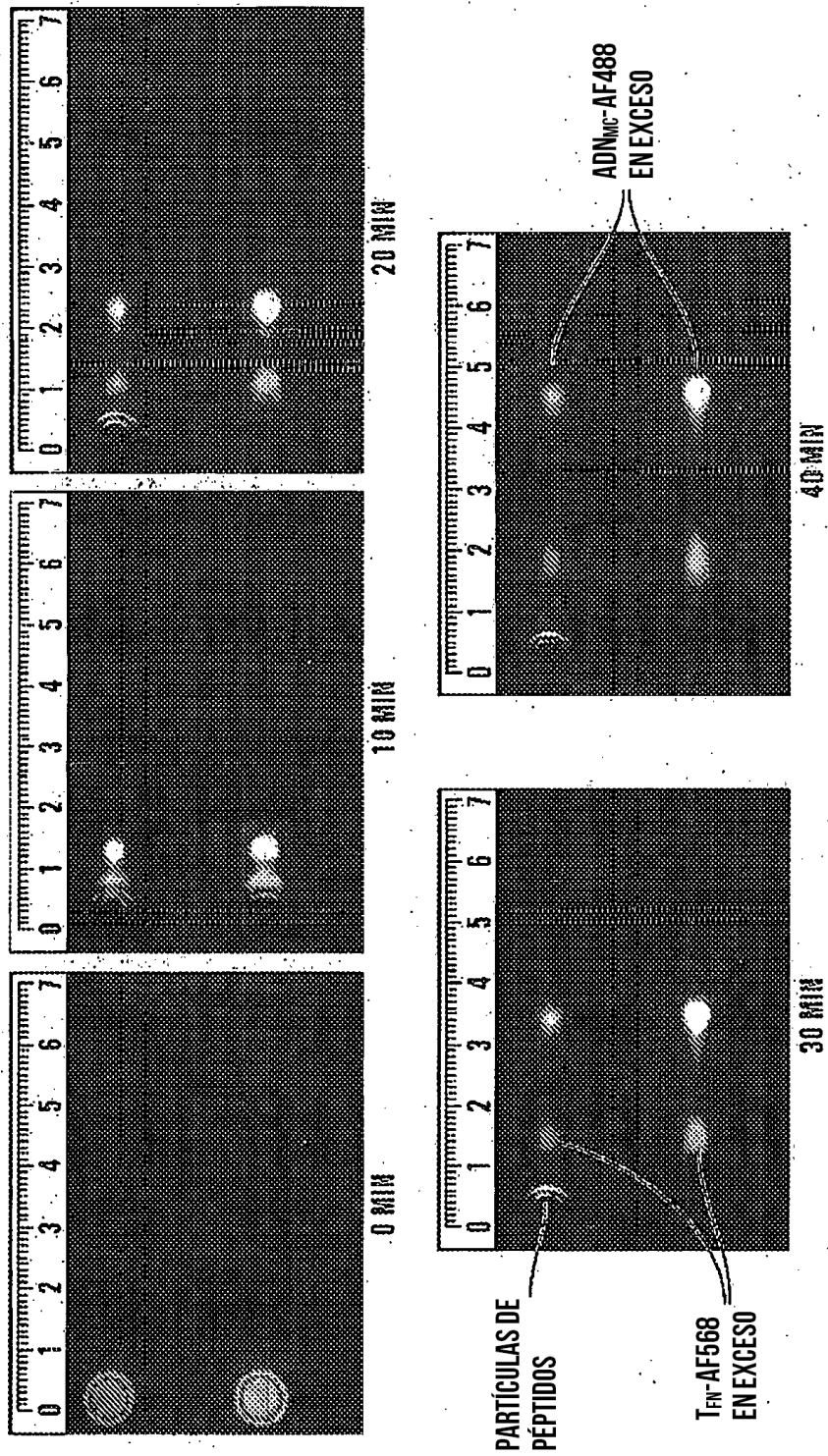


FIG. 20A

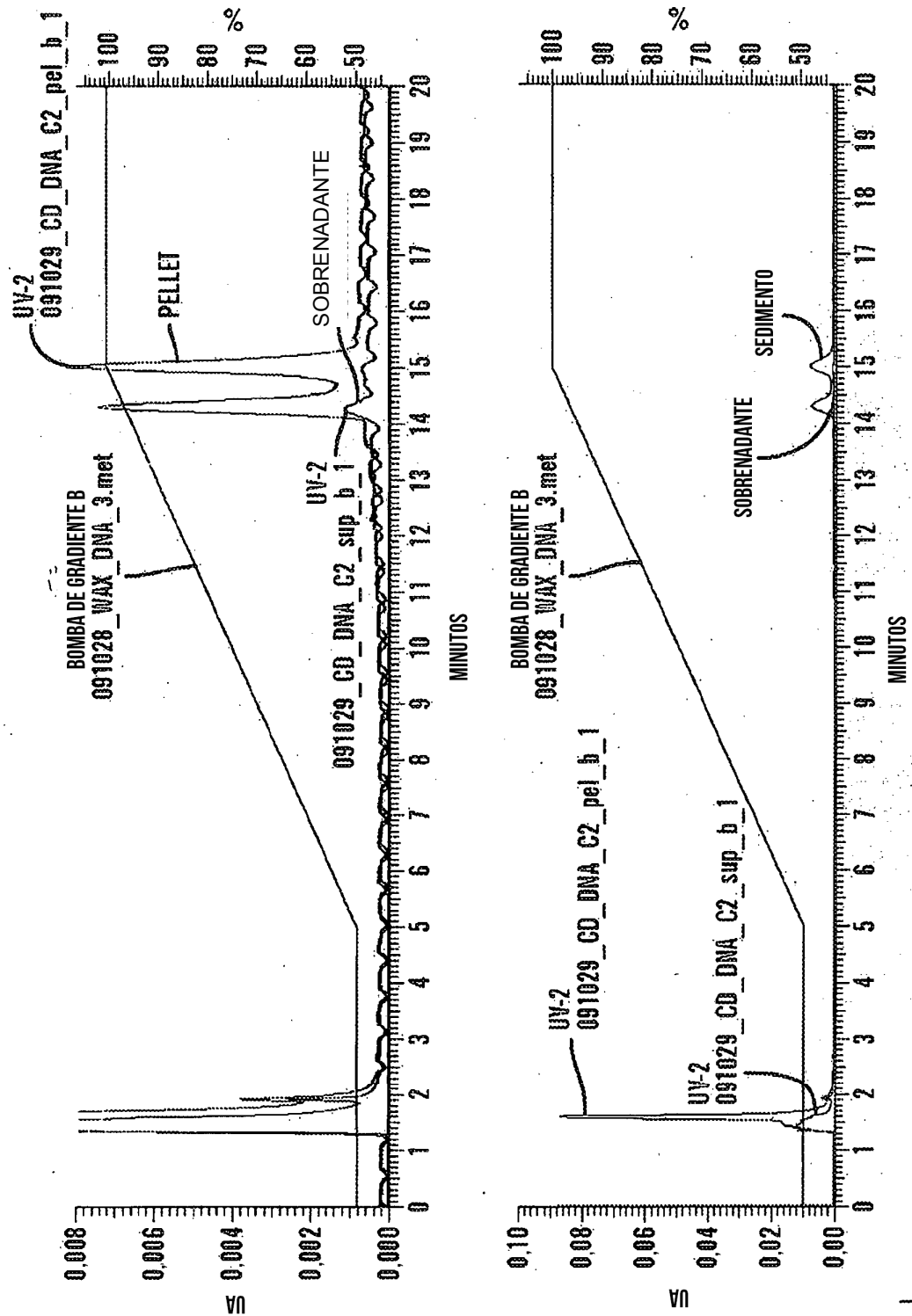
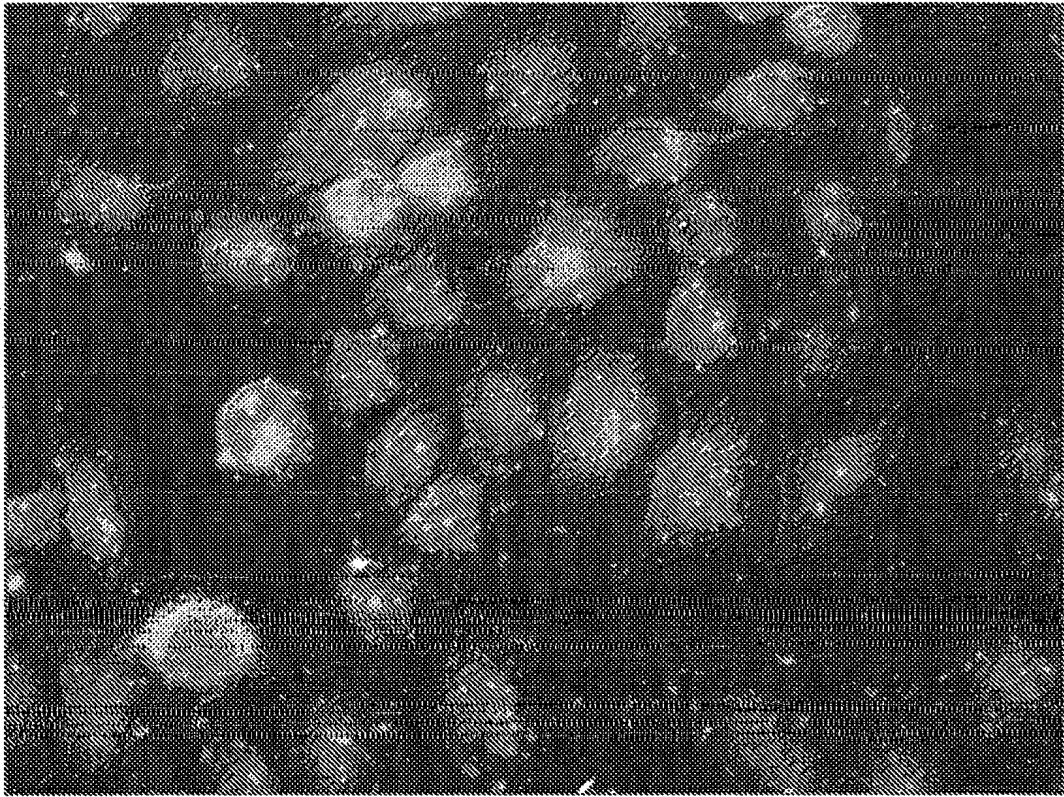


FIG. 20B

FIG. 21



CD3ac (Ac-LK(Ac)-LK(Ac)-LK(Ac)-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH₂) 5,13 μ M
CD3 (H-LK-LK-LK-LW-DL-LW-DL-LW-DL-LW-NH₂)⁴⁺ 0,83 μ M
(5'-TTGTGCCGCCTTTGCAGGTGTATC-3')²⁴⁻ 0,45 μ M
(AF488-5'-TTGTGCCGCCTTTGCAGGTGTATC-3')²⁴⁻ 20 nM
Tfn-AF568 4,14 μ g/ml

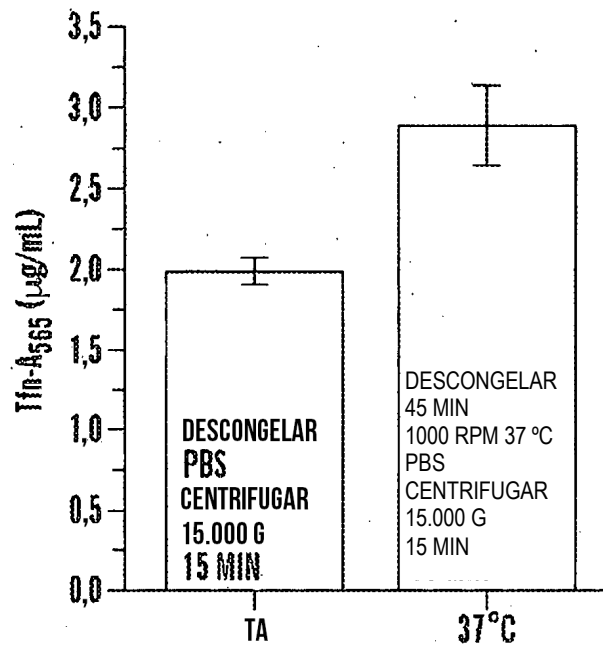


FIG. 22A

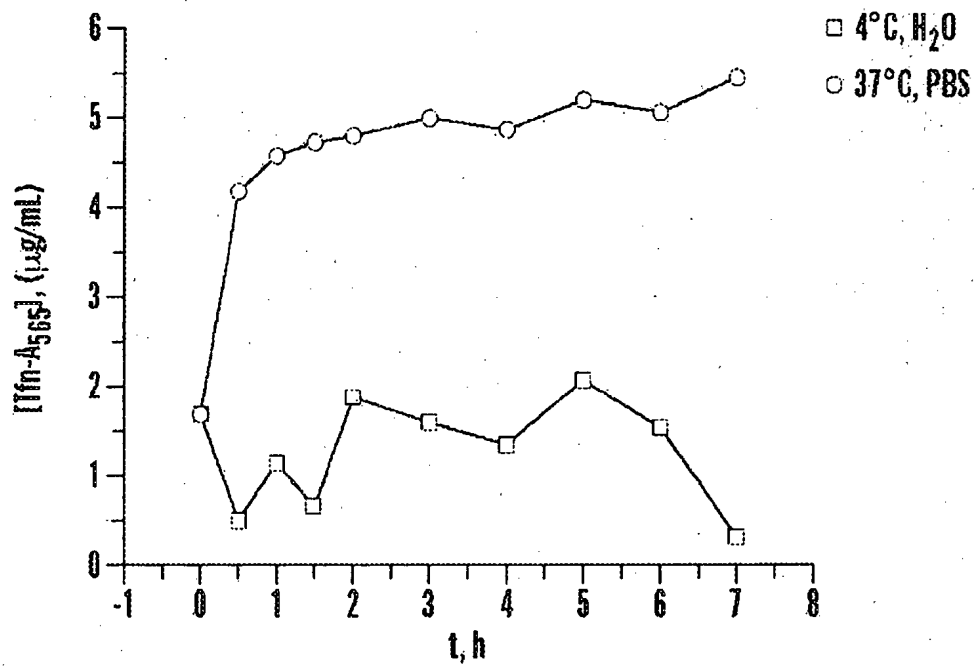


FIG. 22B

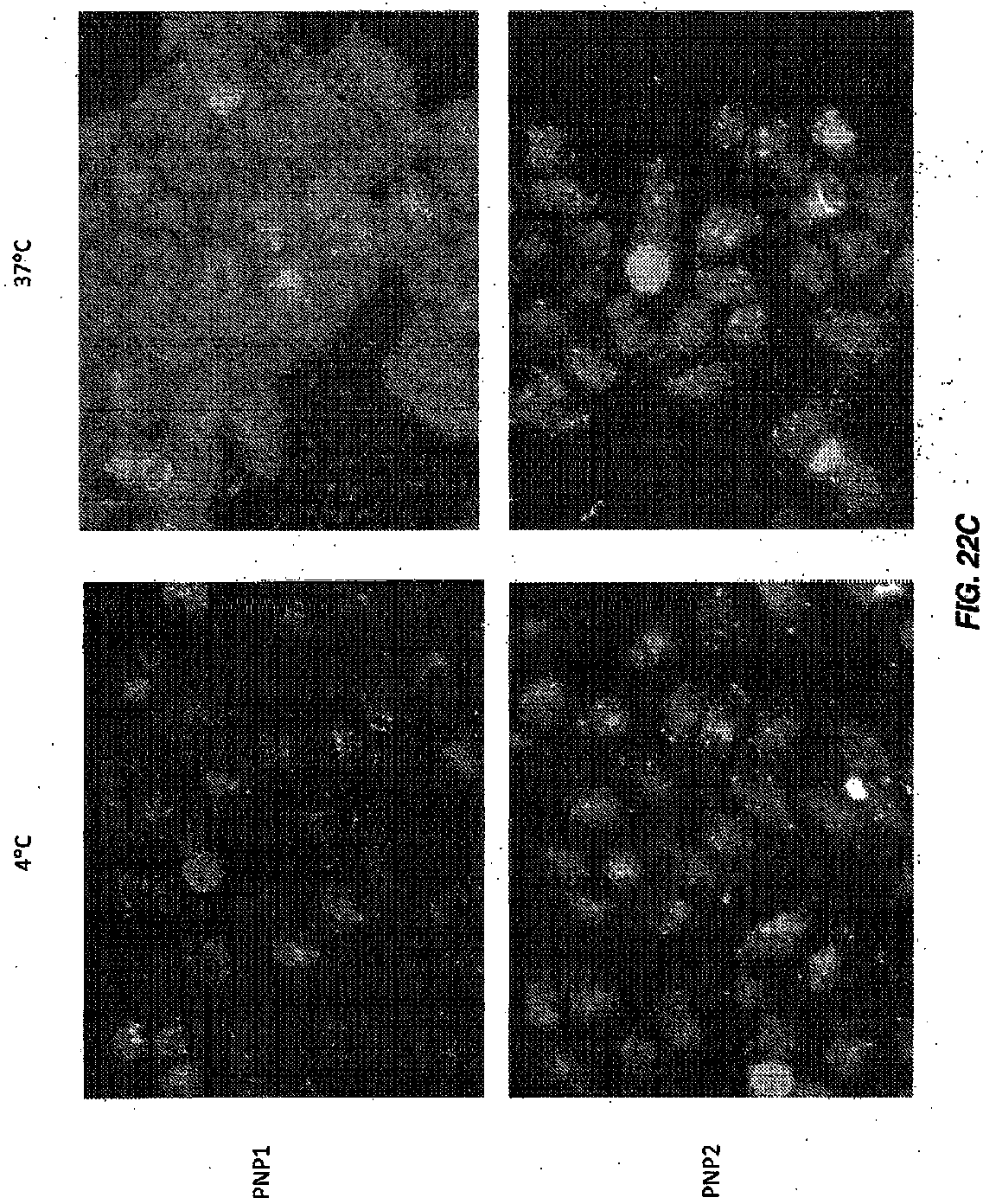


FIG. 22D

