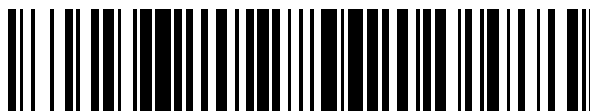


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 822**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 47/42 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2013 PCT/EP2013/070676**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO14053622**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2013 E 13773241 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2951196**

54 Título: **Péptidos de penetración celular para administración intracelular de moléculas**

30 Prioridad:

04.10.2012 WO PCT/IB2012/055343

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.07.2017

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (100.0%)
3, Rue Michel-Ange
75016 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**DIVITA, GILLES;
DESHAYES, SÉBASTIEN;
KONATE, KARIDIA y
MORRIS, MAY CATHERINE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU SLP, .

ES 2 627 822 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

Péptidos de penetración celular para administración intracelular de moléculas

La presente invención pertenece al campo de la administración intracelular de moléculas tales como ácidos nucleicos y moléculas hidrofóbicas pequeñas. En particular, la invención se refiere a una nueva familia de péptidos de penetración celular (CPP, del inglés "Cell-Penetrating Peptide"), que presenta una elevada eficacia, una baja toxicidad y un tropismo natural para tejidos cerebrales y de nodo linfático.

Aunque las moléculas pequeñas siguen siendo los principales fármacos utilizados en la práctica clínica, en numerosos casos su impacto terapéutico ha alcanzado limitaciones tales como una capacidad insuficiente para alcanzar dianas, una falta de especificidad, el requisito de elevadas dosis que conducen a toxicidad y efectos secundarios importantes. A lo largo de los últimos diez años, con el objetivo de solventar las limitaciones de las moléculas pequeñas y de las terapias basadas en genes, hemos presenciado una aceleración drástica en el descubrimiento de moléculas terapéuticas de mayor tamaño tales como proteínas, péptidos y ácidos nucleicos que presentan una elevada especificidad por su diana pero que no siguen las reglas de Lipinski. La potencia farmacéutica de dichas moléculas sigue estando restringida por su baja estabilidad *in vivo* y por su baja captación en células. Por lo tanto, la "administración" se ha convertido en el tema central del puzzle terapéutico, y se han establecido nuevos objetivos para validar las estrategias de administración: (a) carencia de toxicidad, (b) eficacia a baja dosis *in vivo*, (c) facilidad de manejo para aplicaciones terapéuticas, (d) liberación endosomal rápida, y (e) capacidad para alcanzar la diana. Aunque se han puesto muchas esperanzas en las estrategias de administración vírica para terapias génicas y celulares, su aplicación clínica se ha visto perjudicada por efectos secundarios y de toxicidad [1,2]. Las investigaciones se han centrado principalmente en el desarrollo de estrategias no víricas, y se han propuesto diferentes métodos que incluyen nanopartículas policatiónicas no lipídicas y formulaciones basadas en péptidos, pero solo algunas de dichas tecnologías han sido efectivas *in vivo* y han alcanzado la práctica clínica. Las Partículas de Penetración Celular (CPP) son una de las estrategias no víricas más prometedoras. Aunque la definición de las CPPs está evolucionando continuamente, generalmente se describen como péptidos cortos de menos de 30 aminoácidos, derivados de proteínas o de secuencias quiméricas. Habitualmente son anfipáticas y poseen una carga neta positiva [3-5]. Las CPPs son capaces de penetrar membranas biológicas, para activar el movimiento de diversas biomoléculas a través de las membranas celulares hacia el citoplasma, y para mejorar su ruta intracelular, facilitando de este modo las interacciones con la diana. Las CPPs pueden subdividirse en dos clases principales, la primera requiere un enlace químico con la carga y la segunda implica la formación de complejos no covalentes estables. Se ha publicado que las CPPs de ambas estrategias favorecen la administración de un gran panel de cargas (ADN de plásmido, oligonucleótido, siARN, PNA, proteína, péptido, liposoma, nanopartícula...) en una amplia variedad de tipos celulares y modelos *in vivo* [3-7].

Hace veinte años se propuso el concepto de dominio de transducción de proteína (PTD, del inglés "Protein Transduction Domain") en base a la observación de que algunas proteínas, principalmente factores de transcripción, podían transportarse en el interior de las células y desde una célula a otra [para una revisión véase las ref. 3,4]. La primera observación se realizó en 1988, por Frankel y Pabo. Ellos demostraron que la proteína transactivadora de la transcripción (Tat) del VIH-1 podía entrar en las células y traslocalizarse en el núcleo. En 1991, el grupo de Prochiantz alcanzó las mismas conclusiones con el homeodominio de *Drosophila Antennapedia* y demostraron que dicho dominio era internalizado por células neuronales. Estos trabajos fueron el origen del descubrimiento en 1994 del primer Dominio de Transducción de Proteína: un péptido de 16 unidades derivado de la tercera hélice del homeodominio de *Antennapedia* denominado Penetratina. En 1997, el grupo de Lebleu identificó la secuencia mínima de Tat requerida para la captación celular y las primeras pruebas-de-concepto de la aplicación de PTD *in vivo* fueron publicadas por el grupo de Dowdy, para la administración de péptidos pequeños y proteínas grandes. Históricamente, la noción de Péptido de Penetración Celular (CPP) fue introducida por el grupo de Langel, en 1998, con el diseño del primer vehículo péptido quimérico, el Transportan, que fue derivado del fragmento N-terminal del neuropéptido galanina, ligado a mastoparan, un péptido de veneno de avispa. Originalmente, el transportan fue empleado para mejorar la administración de PNAs en células cultivadas e *in vivo*. En 1997, el grupo de Heitz y Divita propusieron una nueva estrategia que implicaba CPP en la formación de complejos estables pero no covalentes con su carga [7]. La estrategia se basó primeramente en el vehículo péptido corto (MPG) que consistía en dos dominios: un dominio hidrofílico (polar) y un dominio hidrofóbico (apolar). El MPG se diseñó para la administración de ácidos nucleicos [7]. El péptido anfipático primario Pep-1 fue propuesto entonces para la administración no covalente de proteínas y péptidos [8]. A continuación los grupos de Wender y Futaki demostraron que las secuencias de poliarginina (Arg8) son suficientes para conducir moléculas pequeñas y grandes al interior de células e *in vivo*. Desde entonces, se han identificado muchos CPPs derivados de secuencias naturales o no naturales y la lista está aumentando constantemente. Se han derivado péptidos de la proteína VP22 del Virus del Herpes Simple, de calcitonina, de péptidos antimicrobianos o de toxina, de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, así como en péptidos ricos en poliprolina [revisiones 4-6].

Los inventores ahora han diseñado una nueva familia de péptidos de penetración celular para la administración de péptidos/proteínas y moléculas hidrofóbicas, denominada VEPEP-3. Las estrategias de administración usando péptidos VEPEP-3 como capa exterior de nanopartículas se denominan NANOPEP-3.

VEPEP-3 son péptidos anfipáticos primarios cortos que forman nanopartículas estables con moléculas tales como péptido, proteína, análogo de péptido, PNA y moléculas hidrofóbicas pequeñas, designadas a partir de este punto SHM (del inglés "Small Hydrophobic Molecules"). Los vectores VEPEP-3 comprenden la siguiente secuencia de aminoácidos: $X_3X_4X_1X_2X_5X_4X_1X_2X_6X_7X_1X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}$ (SEQ ID No: 11), en donde:

- 5 X_1 es F o W (independiente uno del otro);
 X_2 es F, W o Y (independiente uno del otro);
 X_5 es E, R o S;
 X_6 es R, T o S;
 X_7 es E, R o S;

- 10 X_8 no es ni F ni W;
 X_9 es P o R;
 X_{10} es R o L;
 X_{11} es K, W o R;
 X_{12} es R o F; y

- 15 X_{13} es R o K.

Según una realización particular, dicho péptido de penetración celular comprende una secuencia de aminoácidos $X_3X_4WX_2EX_4WX_2X_6X_7X_1PRX_{11}RX_{13}$ (SEQ ID No: 12), en donde

- X_1 es F o W (independiente uno del otro);
 X_2 es F, W o Y (independiente uno del otro);
20 X_3 es beta-A o S;
 X_4 es K o R;
 X_6 es T o R;
 X_7 es E o R;
 X_{11} es R o K; y
25 X_{13} es R o K.

Los ejemplos no limitativos de péptidos de penetración celular según el párrafo anterior comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- $X_3KWFERWFREWPRKRR$ (SEQ ID No: 1)
 $X_3KWWERWWREWPRKRK$ (SEQ ID No: 2)
30 $X_3RWWEKWWTRWPRKRK$ (SEQ ID No: 3), y
 $X_3RWYEKWYTEFPRRRR$ (SEQ ID No: 4),
en donde X_3 es beta-A o S.

Según otra realización particular de la presente invención, el péptido de penetración celular comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: $X_3X_4X_1WX_5X_4X_1WX_6X_7WX_8X_9X_{10}WX_{12}R$ (SEQ ID No: 13), en donde

- 35 X_1 es F o W (independiente uno del otro);
 X_3 es beta-A o S;
 X_4 es K, R o L;
 X_5 es R o S;
 X_6 es R o S;

X₇ es R o S;

X₈ es F o W;

X₉ es R o P;

X₁₀ es L o R; y

5 X₁₂ es R o F.

Según una realización particular del anterior péptido de penetración celular, X₁₂ es R.

Los ejemplos no limitativos de péptidos de penetración celular según los anteriores párrafos comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

X₃RWWRLWWSWFRWLWRR (SEQ ID No: 5)

10 X₃LWWRRWWSRWPRWRR (SEQ ID No: 6)

X₃LWWSRWWSWFRWLWFR (SEQ ID No: 7), y

X₃KFWSRFWRSWFRWLWRR (SEQ ID No: 8),

en donde X₃ es beta-A o S.

15 La presente invención también pertenece a un péptido de penetración celular grapado procedente de un péptido de penetración celular VEPEP-3 como el descrito anteriormente. Un péptido "grapado" designa un péptido que comprende un enlace químico (además de la cadena de aminoácidos) entre dos residuos. En una realización particular de los péptidos VEPEP-3 grapados, el péptido VEPEP-3 comprende un enlace hidrocarbonado entre dos residuos que están separados por tres o seis residuos. El especialista puede obtener dichos péptidos usando técnicas disponibles en la técnica, por ejemplo tal como se describe en Verdine y Hilinski, Methods in Enzymology, 2012 [12].

20 Una realización particular de VEPEP-3 grapado según la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos derivada de la SEQ ID No: 11 o de la SEQ ID No: 12 por adición de un aminoácido no natural entre los aminoácidos de las posiciones 2 y 3 de dicha secuencia (correspondientes a X₁₄), sustitución del aminoácido de la posición 10 (correspondiente a X₇) de la SEQ ID No: 12 por un aminoácido no natural, y adición de un enlace hidrocarbonado entre estos dos aminoácidos no naturales. Un ejemplo de dicho CPP VEPEP-3 grapado comprende la secuencia de aminoácidos X₃KX₁₄WWRWWRX₇WPRKRK (SEQ ID No: 9), en donde X₃ es una beta-alanina o una serina, en donde X₁₄ y X₇ son aminoácidos no naturales usados para la unión de un enlace hidrocarbonado.

30 Otra realización de VEPEP-3 grapado según la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos diseñada por sustitución de los aminoácidos de las posiciones 5 y 12 de la SEQ ID No: 13 por aminoácidos no naturales, y por la adición de un enlace hidrocarbonado entre los dos aminoácidos no naturales (entendiéndose que el proceso de síntesis integra directamente los aminoácidos no naturales). Por ejemplo, un péptido VEPEP-3 grapado comprende la secuencia de aminoácidos X₃RWWX₅LWWSWX₈RLWRR (SEQ ID No: 10), en la que X₃ es una beta-alanina o una serina, y en donde X₅ y X₈ son aminoácidos no naturales usados para la unión de un enlace hidrocarbonado.

35 La estrategia de VEPEP-3 mejora tanto la administración *ex vivo* como *in vivo* y la eficacia del péptido/proteína/análogo de péptido y de moléculas hidrofóbicas pequeñas, sin activar la respuesta inmune innata o ni inducir efectos secundarios tóxicos.

40 Según una realización preferida, un péptido de penetración celular de la presente invención comprende además, ligado covalentemente al extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos, una o varias entidades químicas seleccionadas del grupo que consiste en un acetilo, un ácido graso, un colesterol, un poli-etilen glicol, una señal de localización nuclear, una señal de exportación nuclear, un anticuerpo, un polisacárido y una molécula dirigida a diana (péptido, ácido graso, sacárido).

Tal como se desarrolla más adelante y como se muestra al menos en el Ejemplo 5 presentado a continuación, la PEGilación de péptidos VEPEP-3 es particularmente ventajosa para estabilizar nanopartículas *in vivo*.

45 Adicional o alternativamente, un péptido de penetración celular según la invención puede comprender, ligado covalentemente al extremo C-terminal de su secuencia de aminoácidos, uno o varios grupos seleccionados del grupo que consiste en una cisteamida, una cisteína, un tiol, una amida, un ácido nitrilotriacético sustituido opcionalmente, un carboxilo, un alquilo C1-C6 lineal o ramificado opcionalmente sustituido, una amina primaria o secundaria, un derivado osídico, un lípido, un fosfolípido, un ácido graso, un colesterol, un polietilen glicol, una señal de localización nuclear, una señal de exportación nuclear, un anticuerpo, un polisacárido y una molécula dirigida a diana.

Otro aspecto de la presente invención es un complejo que comprende un péptido de penetración celular como el descrito anteriormente y una carga seleccionada entre proteína/péptido y moléculas hidrofóbicas. Los ejemplos de cargas de polipéptidos son péptidos o proteínas pequeños, péptidos cíclicos, biomarcadores basados en péptidos, bio-fármacos, PNA u oligonucleótidos no cargados eléctricamente. En una realización preferida del complejo según la invención, la carga es una molécula pequeña (de tamaño inferior a 1,5 kDa), tanto hidrofóbica como cargada eléctricamente. Las cargas preferidas de los complejos según la presente invención son fármacos anticancerígenos y antiviricos. Los ejemplos no limitativos de moléculas hidrofóbicas pequeñas que pueden usarse incluyen aminoácidos, di- o tri-péptidos (marcados o no), daunomicina, Paclitaxel, doxorubicina, AZT, porfirina, nucleósidos marcados fluorescentemente o nucleótidos (FAM-Guanosina, CY5-UTP, CY3-UTP), maghemita hidrofóbica (agentes de contraste o nanopartículas magnéticas de Fe₂O₃) y colorantes fluorescentes.

El tamaño de los complejos descritos anteriormente preferiblemente se encuentra entre 50 y 300 nm, más preferiblemente entre 50 y 200 nm (el tamaño del complejo en la presente memoria designa su diámetro medio).

En los complejos según la invención, la ratio molar carga/VEPEP-3 depende de la naturaleza y del tamaño de la carga, pero generalmente está comprendida entre 1/1 y 1/50. Para cargas de péptidos pequeños, la ratio molar carga/VEPEP-3 preferiblemente oscila entre 1/5 y 1/20. Para cargas de moléculas pequeñas, la ratio molar carga/VEPEP-3 preferiblemente oscila entre 1/3 y 1/10. Para cargas de proteínas grandes, la ratio molar carga/VEPEP-3 preferiblemente oscila entre 1/10 y 1/40.

Según una realización ventajosa de los complejos tal como se han descrito anteriormente, los péptidos VEPEP-3 comprenden un grupo polietilén glicol o un grupo acetilo unido covalentemente a su extremo N, y/o un grupo cisteamida unido covalentemente a su extremo C.

Los complejos anteriores pueden usarse ventajosamente como “envolturas de núcleo” para obtener complejos más grandes, o nanopartículas, mediante una etapa adicional de recubrimiento del complejo carga/VEPEP-3 con otra capa de péptidos de penetración celular, que pueden ser diferentes de los péptidos VEPEP-3 descritos anteriormente. Los ejemplos de dichas nanopartículas son VEPEP-3/CADY (en donde CADY es un CPP como el descrito en la patente EP1795539 y en [11], por ejemplo CADY-1: Ac-GLWRALWRLRLSLWRLWKA-cisteamida (SEQ ID No: 28)), VEPEP-3/PEP-1 (en donde Pep-1 es un CPP como el descrito en [8]), VEPEP-3/MPG (en donde MPG es un CPP como el descrito en la patente US7.514.530 y en [7,10]), así como nanopartículas con una capa exterior fabricada de un CPP que pertenece a otra familia VEPEP, por ejemplo seleccionada de la siguiente lista:

VEPEP-6a: Ac-X₃LFRALWRLRLSLWRLWKA-cisteamida (SEQ ID No: 29)

VEPEP-6b: Ac-X₃LWRALWRLWRLSLWRLWKA-cisteamida (SEQ ID No: 30)

VEPEP-6c: Ac-X₃LWRALWRLRLSLWRLWRKA-cisteamida (SEQ ID No: 31)

VEPEP-6d: Ac-X₃LWRALWRLWRLSLWRLWRKA-cisteamida (SEQ ID No: 32)

VEPEP-6e: Ac-X₃LWRALWRLRLALWRLWKA-cisteamida (SEQ ID No: 33)

VEPEP-6f: Ac-X₃LWRALWRLRLNLWRLWKA-cisteamida (SEQ ID No: 34)

VEPEP-9a1: Ac-X₃LRWWLRWASRWFSRWAWWR-cisteamida (SEQ ID No: 35)

VEPEP-9a2: Ac-X₃LRWWLRWASRWASRWAWFR-cisteamida (SEQ ID No: 36)

VEPEP-9b1: Ac-X₃RWWLRWASRWALSWRWWR-cisteamida (SEQ ID No: 37)

VEPEP-9b2: Ac-X₃RWWLRWASRWFLSWRWWR-cisteamida (SEQ ID No: 38)

VEPEP-9c1: Ac-X₃RWWLRWAPRWFPSRWWR-cisteamida (SEQ ID No: 39)

VEPEP-9c2: Ac-X₃RWWLRWASRWAPSWRWWR-cisteamida (SEQ ID No: 40)

VEPEP-9d: Ac-X₃WWRWASWARSWWR-cisteamida (SEQ ID No: 41)

VEPEP-9e: Ac-X₃WWGSWATPRRRWWR-cisteamida (SEQ ID No: 42)

VEPEP-9f: Ac-X₃WWRWAPWARSWWR-cisteamida (SEQ ID No: 43)

ST-VEPEP-6a: Ac-X₃LFRALWR_SLLRS_SLWRLWKA-cisteamida (SEQ ID No: 44)

ST-VEPEP-6aa: Ac-X₃LFLARWR_SLLRS_SLWRLWKA-cisteamida (SEQ ID No: 45)

ST-VEPEP-6ab: Ac-X₃LFRALWS_SLLRS_SLWRLWKA-cisteamida (SEQ ID No: 46)

ST-VEPEP-6ad: Ac-X₃LFRARWS_SLLRS_SLWRLWKA-cisteamida (SEQ ID No: 47)

ST-VEPEP-6b: Ac-X₃LFRALWRLLR_SSLWS_SLLWK-cisteamida (SEQ ID No: 48)

ST-VEPEP-6ba: Ac-X₃LFRARWRLLR_SSLWS_SLLWK-cisteamida (SEQ ID No: 49)

ST-VEPEP-6bb: Ac-X₃LFRALWRLLS_SSLWS_SLLWK-cisteamida (SEQ ID No: 50)

ST-VEPEP-6bd: Ac-X₃LFRARWRLLS_SSLWS_SLLWK-cisteamida (SEQ ID No: 51)

5 ST-VEPEP-6c: Ac-X₃LFAR_SLWRLLR_SSLWRLWK-cisteamida (SEQ ID No: 52),

así como todas las variantes de los mismos (con respecto a la secuencia de aminoácidos y/o los grupos químicos N- y C-terminales), en donde X₃ es beta-A o S y donde los residuos seguidos de una "s" en subíndice están unidos mediante un enlace hidrocarbonado. Las variantes preferidas de las anteriores secuencias para formar nanopartículas según la invención están PEGiladas en su extremo N-terminal en lugar de estar acetiladas.

10 Otro aspecto de la presente invención pertenece a nanopartículas preparadas a partir de una "envoltura de núcleo" que comprende una carga y una primera molécula vehículo, rodeada de péptidos VEPEP-3. En la presente memoria éstas se denominan partículas "NANOPEP-3". La tecnología NANOPEP-3 constituye un sistema de administración "construido a medida" que contiene una partícula núcleo común, que atrapa la molécula terapéutica, con péptidos VEPEP-3 superficiales que preferiblemente están funcionalizados para ser dirigidos *in vivo* a un tumor o un tejido.

15 Desde un punto de vista estructural, las partículas NANOPEP-3 están constituidas por un "núcleo" que está recubierto por una capa de péptidos VEPEP-3. El "núcleo" corresponde a un complejo que comprende una carga y un vector o vehículo tal como un primer péptido de penetración celular, un liposoma, una estructura policatiónica, una nanopartícula de carbono, etc. En las partículas NANOPEP-3, la capa de péptidos VEPEP-3 (péptido periférico) estabiliza la partícula y puede ser funcionalizada. La funcionalización de la superficie de la partícula NANOPEP-3 con moléculas de colesterol, lípidos o PEG mejora la estabilidad de las partículas *in vivo*, favorece su administración por ruta sistémica o tópica y permite una rápida liberación de cargas activas dentro de las células o tejidos tumorales. Se ha demostrado que la funcionalización de la superficie de las partículas NANOPEP-3 con fragmentos FAB pequeños, péptidos, anticuerpos y lípidos favorece el ataque *in vivo* a dianas de tejido o tumor. Asimismo, la funcionalización de la superficie de la partícula NANOPEP-3 con un polisacárido tal como PLGA, puede usarse

20 como formulación de liberación lenta de fármacos y cargas, y permite una respuesta *in vivo* a largo plazo. Tal como se muestra a continuación en el Ejemplo 5, los inventores han observado que la PEGilación N-terminal de al menos parte de los péptidos VEPEP-3 que rodean a las partículas NANOPEP-3 aumenta la biodistribución de cargas en el tumor, probablemente estabilizando las partículas NANOPEP-3 en el plasma.

La tecnología NANOPEP-3 mejora la administración celular e *in vivo* de cargas biológicamente activas, y ha sido validada en un número grande de líneas celulares que incluyen líneas celulares adherentes y en suspensión, líneas celulares difíciles de transfectar. Las partículas NANOPEP-3 interactúan fuertemente con las membranas celulares y entran en la célula independientemente de la ruta endosómica, o escapan rápidamente de los endosomas tempranos. La tecnología NANOPEP-3 presenta varias ventajas que incluyen una rápida administración con una eficacia muy elevada, estabilidad en tampones fisiológicos, protección de la carga contra degradación, falta de toxicidad y de sensibilidad frente al suero, capacidad para formar nanopartículas mixtas, pueden funcionalizarse y se han aplicado con éxito a la administración de diferentes tipos de cargas en una amplia variedad de niveles terapéuticos y diagnósticos/teragnósticos, así como en obtención de imágenes, por ejemplo obtención de imágenes cerebrales.

En una realización particular de partículas NANOPEP-3 según la presente invención, la carga está formando un complejo con un primer péptido de penetración celular, que puede seleccionarse, por ejemplo, entre CADY, MPG, PEP-1, PPTG1, estructura poli Arginina, péptido de familia VEPEP (VEPEP-3, VEPEP-6, VEPEP-9, grapados o no) como se ha descrito anteriormente (tal como las SEQ ID Nos: 1 a 13 y 19 a 52, y variantes de las mismas), o cualquier otro CPP conocido. Dicho complejo carga/CPP se recubre entonces con una capa de péptidos VEPEP-3. Según esta realización, el especialista en la técnica elegirá de forma ventajosa el primer CPP en función de la naturaleza de la carga, de tal modo que el complejo de la carga y el primer CPP sea estable. Por tanto, se puede incluir una amplia diversidad de cargas en partículas NANOPEP-3.

En las nanopartículas descritas anteriormente, la ratio molar núcleo/VEPEP-3 depende de la naturaleza y del tamaño del núcleo, pero generalmente comprende entre 1/1 y 1/50. Para péptidos/núcleos de CPP pequeños, la ratio molar núcleo/VEPEP-3 periférico preferiblemente oscila entre 1/5 y 1/30, dependiendo de la naturaleza de la carga del péptido (hidrofobicidad y carga).

En una realización preferida de las nanopartículas según la invención, el tamaño de la nanopartícula está entre 20 y 300 nm.

Según una realización ventajosa de las partículas NANOPEP-3 según la invención, los péptidos VEPEP-3 que forman la capa periférica de las nanopartículas comprenden un polietilen glicol o un grupo acetilo unido covalentemente a su extremo N, y /o un grupo cisteamida unido covalentemente a su extremo C.

Según otra realización preferida, la envoltura de núcleo de las partículas está recubierta con un péptido VEPEP-3 funcionalizado con NTA (por ejemplo, un péptido VEPEP-3 con ácido nitrilotriacético unido covalentemente a su extremo C). Esto permite la unión posterior a la superficie de la partícula, de cualquier proteína (u otra molécula) que albergue una etiqueta de histidina. Esta estrategia ofrece la ventaja principal de presentar partículas bicapa comunes “NANOPEPHIS-3” que pueden asociarse con cualquier molécula marcada con His.

En realizaciones particulares de los complejos y nanopartículas según la invención, al menos parte de los péptidos de penetración celular VEPEP-3 están ligados a una molécula dirigida a diana. En el caso de las partículas NANOPEP-3, al menos parte de los péptidos de penetración celular que se encuentran en la periferia de la nanopartícula están ligados preferentemente a una molécula dirigida a diana. Los ejemplos de moléculas dirigidas a diana incluyen anticuerpos, nanocuerpos y fragmentos Fc o FAB (por ejemplo dirigidos a HEK2/MUC1/EGF/XCCR4), ligandos, especialmente dirigidos a receptores que están sobre-expresados en la superficie de determinados tipos celulares y que albergan péptidos específicos de órganos seleccionados. Los ejemplos no limitativos de dichos ligandos y péptidos albergadores son: péptido-RGD, péptidos albergadores dirigidos a diana (péptido NT1 cerebral, péptido GM1 de ganglio, así como todos los demás péptidos descritos previamente para atacar tejidos y líneas celulares), ácido fólico, polisacáridos, y la estructura de péptido dirigido a metaloproteasa de matriz (MMP-9 o MMP3 para selectividad de tumor).

Según una realización particular de la presente invención, los complejos o nanopartículas se formulan de tal modo que puedan almacenarse durante varios meses sin perder su estabilidad y eficacia funcional. Tal como se describe a continuación en el ejemplo 5, los complejos y nanopartículas de la invención pueden liofilizarse de forma ventajosa en presencia de un azúcar. Los ejemplos no limitativos de azúcares que pueden usarse para tal fin son sacarosa, glucosa, manitol y una mezcla de los mismos, y pueden usarse, por ejemplo, en una concentración que oscila entre el 5% y el 20%, preferiblemente entre el 5% y el 10%, entendiéndose que una concentración del 5% se obtiene añadiendo 5 gramos por litro de disolución antes de la liofilización.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de un complejo o nanopartícula como los descritos anteriormente, como medicamento y como marcador o agente para la obtención de imágenes.

En particular, los complejos VEPEP-3/carga y las partículas NANOPEP-3 pueden usarse de forma ventajosa en el tratamiento de una enfermedad cerebral y/o una enfermedad de nodos linfáticos, por ejemplo dirigidos a un patógeno latente localizado en el cerebro y/o en un nodo linfático. También pueden usarse para la obtención de imágenes cerebrales o de nodos linfáticos.

La presente invención también pertenece a una composición terapéutica, cosmética o diagnóstica que comprende un complejo o una nanopartícula como los descritos anteriormente. Por ejemplo, una composición que comprende un complejo o nanopartícula que tiene un péptido dirigido a interacciones proteína/proteína, que implica como carga una proteína esencial CDL y Cliclina requeridas para la progresión del ciclo celular, y una molécula dirigida a diana específica de células tumorales (por ejemplo: péptido RGD, ácido fólico, anticuerpos o nanocuerpos MUC-1 o HEK2), es parte de la presente invención. Dependiendo de la aplicación, esta composición se puede formular para administración intravenosa, intratumoral, tópica, intrarrectal, intranasal, transdérmica o intradérmica, o para administración a través de un spray bucal, o para administración como implante subcutáneo para una liberación lenta de un fármaco.

La presente invención también pertenece a un método para administrar una molécula al interior de una célula *in vitro*, que comprende una etapa de poner dicha célula en contacto con un complejo o nanopartícula como los descritos anteriormente.

En los siguientes ejemplos se desarrollan más detalladamente varios aspectos de la presente invención, ilustrados por las figuras (que se describen en los ejemplos).

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Péptidos VEPEP-3

Todos los péptidos fueron sintetizados mediante síntesis de péptidos en fase sólida usando AEDI-resina expansina con (fluorenilmetoxi)-carbonilo (Fmoc) en un Sintetizador de Péptidos Pioneer (Pioneer™, Applied Biosystems, Foster City, CA) partiendo de resina Fmoc-PAL-PEG-PS en una escala de 0,2 mmol. Las reacciones de acoplamiento se llevaron a cabo con HATU 0,5 M en presencia de DIEA 1 M. La eliminación del grupo protector y la liberación final de la resina se llevaron a cabo con TFA/Fenol/H₂O/Tioanisol/Etanoditiol (82,5/5/5/5/2,5 %) durante 3h y 30 minutos. Todos los péptidos presentaron un grupo cisteamida en el extremo C y estaban acetilados en el extremo N. La síntesis de péptidos comenzó en el extremo C, usando una resina AEDI-expansina a partir de un enlace de cisteamida, tal como describen Mery et al., 1992 [9]. Todos los péptidos contenían una beta-Alanina o una serina en el extremo N para favorecer cualquier funcionalización posterior sin usar el grupo cisteamida C-terminal.

Funcionalización de VEPEP-3

Se usaron dos estrategias para la funcionalización de péptidos:

Se llevaron a cabo conjugaciones de péptido con péptido, anticuerpo, pegilación, NTA, colesterol, estearilación en el grupo amino primario del residuo N-terminal, a través de una beta alanina o serina. Es ventajoso mantener la cisteamida C-terminal libre, ya que se sabe que es requerida para estabilizar la partícula a través de enlaces disulfuro (SH-SH). Los péptidos funcionalizados fueron purificados adicionalmente mediante HPLC de fase inversa y analizados mediante espectroscopia de masas de ionización por electropulverización.

También se llevaron a cabo configuraciones de péptido a través de enlaces disulfuro usando el grupo SH del resto cisteamida del péptido.

VEPEP-3-Funct-1: X-LWWRRWWSRWPRWRR-CH₂-CH₂-SH (SEQ ID No: 14)

VEPEP-3-Funct-2: Ac-LWWRRWWSRWPRWRR-CH₂-CH₂-S-S-X (SEQ ID No: 15)

VEPEP-3-Funct-3: X-W(W-F)RLW(W-F)RLR-CH₂-CH₂-SH (SEQ ID No: 16)

VEPEP-3-Funct-4: Ac-W(W-F)RLW(W-F)RLR-CH₂-CH₂-S-S-X (SEQ ID No: 17)

X: Colesterol, Pegilación, estearilo, palmitoilo, fragmentos FC o FAB pequeños, nanocuerpo, ácido nitrilotriacético (2 x NTA), péptidos dirigidos a tejidos (cerebro, pulmón, nodo linfático, páncreas,...)

Estructura VEPEP-3

Los péptidos VEPEP-3 son péptidos anfipáticos primarios; son altamente versátiles y muestran un fuerte polimorfismo estructural. Los VEPEP-3 están desplegados en disolución como forma libre y adoptan una conformación de hélice alfa en la parte N-terminal en presencia de lípidos o membranas celulares artificiales, así como en presencia de cargas tales como péptidos o proteínas.

Péptidos y proteínas

Los péptidos dirigidos a CDK/Ciclina (secuencias C4, C2 de las SEQ ID Nos: 20 a 23) o integrasa de VIH (secuencias PC4 y PC6 de las SEQ ID Nos: 24 a 27), versión lineal o cíclica, fueron obtenidos para Polipéptido.

C2: KKQVLAMEHLVT (SEQ ID No: 20)

C2S: VTLMEAKKQVLT (SEQ ID No: 21)

C4: KKQVRMAHLVLT (SEQ ID No: 22)

C4C: CKKQVRMAHLVLTC (SEQ ID No: 23)

PC4, también denominado PC4D: RWTEWEWW (SEQ ID No: 24)

PC4S: TWFTWFT (SEQ ID No: 25)

PC6, también denominado PC6D: KWETWWET (SEQ ID No: 26)

PC6S: KAETWAET (SEQ ID No: 27)

Proteínas; que incluyen GFP sobreexpresada en *E. coli*, y nanocuerpos de proteína corta, que corresponden a anticuerpos de chameleidea también se expresaron en *E. coli*.

Oligonucleótidos y PNA

Se sintetizaron oligonucleótidos cortos, PNA y 5' Alexa⁷⁰⁰ o PNA Cy5 marcado fluorescentemente mediante Eurogentec (Bélgica) según las siguientes secuencias:

Cyc-B1a; TGC CAT CGG GCT TGG AGG-^{CY5} (SEQ ID No: 18)

Cyc-Bct; TGC CAT CAA GCT TAG AGG-^{CY5} (SEQ ID No: 19)

Valoraciones de fluorescencia

Se llevaron a cabo experimentos de fluorescencia en un espectrofluorímetro PTI a 25°C en un tampón de NaCl 154 mM. Se excitó la fluorescencia-Trp intrínseca del VEPEP-3 a 290 nm y se registró el espectro de emisión entre 310 y 400 nm, con un paso de banda espectral de 2 y 8 nm para la excitación y la emisión, respectivamente. La fluorescencia-FITC del péptido marcado se excitó a 492 nm y la emisión se registró entre 500 y 580 nm. Para la interacción VEPEP-3/péptido, se valoraron 0,5 µM del péptido marcado con FITC con concentraciones crecientes de VEPEP-3. Todas las medidas fueron corregidas por la dilución y el ajuste de la curva se realizó mediante el software Grafit (Erithacus).

Caracterización de nanopartículas basadas en péptido

Se determinó la distribución de tamaño medio de partícula con un Coulter N4 Plus (Coulter-Beckman) a 25°C durante 3 minutos por medida, y se midió el potencial zeta con un aparato Zetasizer 4 (Malvern Ltd.).

Cultivo celular y administración de carga mediada por VEPEP

- Se cultivaron líneas celulares adherentes de fibroblastos HS68, HeLa, PC3, MCF-7, SCK3-Her2 (de la "American Type Culture Collection, ATCC") en medio Eagle Modificado de Dulbecco suplementado con glutamina 2 mM, un 1% de antibióticos (estreptomicina 10.000 µg/mL, penicilina, 10.000 IU/mL) y un 10% (p/v) de suero fetal de ternero (FCS), a 37°C en una atmósfera humidificada y con un 5% de CO₂. Se prepararon disoluciones de reserva de partículas VEPEP-3/péptido complejando péptido 1 µM con péptidos VEPEP-3 en una ratio molar de 1/20 durante 30 minutos a 37°C. Mediante dilución en serie de las disoluciones reserva en PBS se obtuvieron concentraciones menores de VEPEP-3-vehículo/péptido (de 500 nM a 1 µM), con el objetivo de preservar la misma ratio VEPEP-3-vehículo/péptido. Se crecieron 150.000 células sembradas en un platillo de 35 mm el día antes de la transfección, hasta un 60% de confluencia y se recubrieron con 200 µL de complejos preformados, se incubaron durante 3-5 minutos y a continuación se añadieron 400 µL de DMEM. Después de 30 minutos de incubación a 37°C, se añadió 1 mL de DMEM fresco que contenía un 16% de suero fetal de ternero (FCS) a fin de alcanzar una concentración final de FCS del 10%, sin eliminar el recubrimiento de complejos VEPEP-3/péptido. Se devolvieron las células al incubador durante 24 horas. Para los péptidos derivados de cdk4 y CDK2 se monitorizó la proliferación celular tras 24 y 48 h. Para la integrasa dirigida a péptido, se analizó la proliferación de VIH en células PBMC activadas después de 3 y 5 días. Los datos presentados son una media de 3 ó 4 experimentos distintos.

Citotoxicidad

- La toxicidad de los complejos VEPEP-3/péptido o VEPEP-3/proteína se investigó en líneas celulares Hela y HS-68. 30.000 células sembradas en placas de 24 pocillos el día antes de la transfección fueron incubadas con concentraciones crecientes de péptido o proteína acomplejados con VEPEP-3 en una ratio molar de 20/1 entre 1 y 5 µM (VEPEP-3 500 µM), durante 30 minutos antes de la adición de medio para alcanzar una concentración final del 10% de FCS. Se midió la respuesta citotóxica 12h o 24h después de monitorizar el nivel de ARNm de gen ciclofilina doméstico (Quantigen, Panomic Inc.) y mediante ensayo MTT colorimétrico (Sigma, Alemania), respectivamente. Para el ensayo MTT, se eliminó el medio de cultivo celular y se sustituyó con PBS que contenía 2,5 mg/mL de MTT durante 4h. Los resultados corresponden a la media de 3 experimentos separados.

Modelos tumorales de ratón

- Se inocularon subcutáneamente ratones nude hembra atímicos (de 6-8 semanas de edad) en el costado con 1×10^6 células PC3, A549 o SCK-3-HEK2 en 100 µL de PBS. De dos a tres semanas después del implante del tumor, cuando el tumor alcanzó un tamaño de aproximadamente 100 mm³, los animales fueron tratados mediante inyección intratumoral o intravenosa, cada 3 días, con una disolución de 0,1 mL de péptido libre derivado de CDK2 o CDK4 (200 µg), péptido de cifrado de control C4C o péptidos C4 o C2 (10, 50, 100 µg) acomplejados con NANOPEP-3 en una ratio molar de 1/20. Se midió el diámetro tumoral en dos direcciones a intervalos regulares usando un calibre digital, y se calculó el volumen tumoral como la longitud x anchura x altura x 0,52. Las curvas muestran el valor medio de tamaño tumoral en una cohorte de seis animales y no se observó la muerte de ningún animal ni ningún signo de toxicidad. Los experimentos fueron llevados a cabo según la normativa nacional y fueron aprobados por el comité local de ética de experimentación con animales. La significación estadística de los resultados se calculó mediante el test de t de *Student* y se consideró estadísticamente significativo $p > 0,05$.

Obtención de imágenes in vivo de la biodistribución de péptido

- Se obtuvieron imágenes de fluorescencia *in vivo* como se ha descrito previamente en Crombez et al, 2009, Nucleic Acid Res [10]. Se inyectaron ratones intravenosamente con 100 µg (200 µL) de péptido (C4) marcado fluorescentemente Alexa700, tanto solo como formando complejo con VEPEP-3 (n = 4 animales por grupo). Los ratones anestesiados, usando isoflurano al 2%, fueron iluminados mediante diodos emisores de luz de 663 nm equipados con filtros de interferencia, y se grabó película durante los primeros 15 minutos y las imágenes de fluorescencia fueron tomadas cada 5 h y después cada 24 h, con una cámara CCD refrigerada de fondo delgado tal y como se ha descrito previamente (Crombez et al, 2009, Nucleic Acid Res). A las 24 h los ratones fueron sometidos a eutanasia y se extrajeron diferentes órganos para cuantificación de fluorescencia Alexa.

Ejemplo 2: aplicaciones de péptidos VEPEP-3 para administración de moléculas

Ejemplo 2.1: los péptidos VEPEP-3 forman nanoestructuras estables con péptidos y proteínas

- Los péptidos VEPEP-3 forman complejos estables con péptidos y proteínas. La unión de cargas a VEPEP-3 se monitorizó mediante espectroscopía de fluorescencia usando los dos grupos Trp intrínsecos de VEPEP-3 (residuos Trp 3 a 5) y cargas extrínsecas marcadas fluorescentemente (usando Cy3, Cy5 o FITC). El ajuste de la curva revela que VEPEP-3 se une fuertemente a las diferentes cargas con una constante de disociación en el rango nanomolar (en la Figura 1 se presentan ejemplos con VEPEP-3a, VEPEP-3C y VEPEP-3g y tres cargas diferentes, todos los datos se incluyen en la Tabla 1).

Ejemplo 2.2: los péptidos VEPEP-3 forman nanoestructuras estables con moléculas hidrofóbicas pequeñas

Los péptidos VEPEP-3 también forman partículas estables con moléculas aromáticas pequeñas que incluyen Daunomicina, Paclitaxel, doxorubicina, porfirina y moléculas cargadas que incluyen nucleótidos, nucleósidos y análogos peptídicos de ácidos nucleicos o colorantes fluorescentes (Figura 1). La constante de disociación para moléculas hidrofóbicas pequeñas oscila entre 0,05 y 2 μM , dependiendo de la naturaleza de los colorantes y de los péptidos.

VEPEP-3	SEQ ID No	Cargas									
		péptido		Péptido cíclico		Proteína		SHM		PNA	
		Unión	Kd (nM)	Unión	Kd (nM)	Unión	Kd (μM)	Unión	Kd (μM)	Unión	Kd (nM)
VEPEP-3a	1	Sí	10-20	Sí	50-100	Sí	1	Sí	1	Sí	100
VEPEP-3b	2	Sí	10-20	Sí	50-100	Sí	0,5	Sí	0,5	Sí	200
VEPEP-3c	3	Sí	10-20	Sí	50-100	Sí	0,2	Sí	0,2	Sí	200
VEPEP-3d	4	Sí	10-20	Sí	50-100	Sí	0,1	Sí	0,1	Sí	100
VEPEP-3e	5	Sí	10-20	Sí	5-20	Sí	0,02-0,1	Sí	0,02	Sí	5-50
VEPEP-3f	6	Sí	10-20	Sí	5-20	Sí	0,02-0,1	Sí	0,02	Sí	5-50
VEPEP-3g	7	Sí	10-20	Sí	5-20	Sí	0,02-0,1	Sí	0,02	Sí	5-50

Tabla 1: Caracterización de los complejos VEPEP-3/Carga. Péptido (C4 y C2), Péptido cíclico (PC4), proteína (GFP y Nanocuerpo), SHM: molécula hidrofóbica pequeña de doxorubicina y PNA (PNA de 15 monómeros).

Ejemplo 2.3: Los péptidos VEPEP-3 forman nanopartículas estables con sus diferentes cargas

- El tamaño de las partículas se monitorizó mediante dispersión de luz dinámica. La ratio molar péptido VEPEP-3/carga óptima oscila entre 1/10 y 1/30. La Figura 2 muestra el análisis DLS de las partículas VEPEP-3a/péptido, VEPEP3c/péptido cíclico, VEPEP-3e-PNA y VEPEP-3g/Doxo formadas con una ratio 1/20 (Figura 2). El tamaño de las partículas es de aproximadamente 100 a 200 nanómetros de diámetro.

Ejemplo 3: Aplicaciones de VEPEP-3 en células cultivadas**Ejemplo 3.1: Administración mediada por VEPEP-3 de péptido y péptido cíclico en diferentes líneas celulares**

Se han usado los péptidos VEPEP-3 para la administración de diferentes péptidos en diferentes líneas celulares, que incluyen líneas celulares primarias, líneas de células madre y líneas celulares de exposición. La administración de péptido se monitorizó usando tres estrategias: espectroscopía de fluorescencia y monitorizando respuestas biológicas (respuestas de anti proliferación y anti vírica).

- El péptido marcado fluorescente se visualizó en las diferentes líneas celulares usando microscopía de fluorescencia o clasificación FACS (Tabla 2). En la mayoría de las líneas celulares, la captación de péptidos marcados con Cy-5 es superior al 70% de las células.

Los experimentos dosis-respuesta llevados a cabo en diferentes células cultivadas revelaron que la administración mediada por VEPEP-3 de péptidos C2 y C4, dirigidos a complejos cdk2/ciclina A o CDK4/ciclina D, bloquea la proliferación celular de diferentes células cancerosas.

Los experimentos dosis-respuesta llevados a cabo con células PBMC activadas infectadas con VIH revelaron que la administración mediada por VEPEP-3 de péptidos PC4D, dirigidos al complejo de pre-integración y a integrasa de VOH, bloquea la replicación vírica (el efecto de PC4D en el complejo con VEPEP-3a, VEPEP-3c y VEPEP-3g se muestra en la Figura 3).

Líneas celulares	Origen	Eficacia de análisis FACS de Cy-5 C4
Hela	Células de cáncer cervical epitelial humano	75%
Jurkat	Linfocito T humano	90%
HepG2	Hepatocito humano	70%
C2C12	Mioblasto de ratón	90%
MEF	Fibroblasto de ratón	90%
HS-68	Fibroblasto humano	90%

CEM-SS	Macrófago humano	80%
U2OS	Osteoblasto humano	91%
MCF7	Adenocarcinoma de mama humano	70%
MT4	Linfocito T humano	70%
HER2	Cáncer de mama humano	90%
MDA-MB	Cáncer de mama humano	70%
PBMC	Macrófago humano	90%

Tabla 2

Ejemplo 3.2: la administración mediada por VEPEP3 de péptidos dirigidos a Cdk2/ciclina A o CDK4/ciclina D induce el arresto de G2 y bloquea la proliferación de células cancerosas

- 5 Los experimentos dosis-respuesta llevados a cabo con células cultivadas revelaron que la administración mediada por VEPEP-3 de péptido C2 y C4 indujo una respuesta biológica robusta asociada al arresto específico del ciclo celular de G2 (Figura 4). Una concentración de péptido C2 o C4 de 200 nM fue suficiente para bloquear la proliferación de células Hela, MCF7, HEK-2, HS-68 y U2OS. Se estimaron valores de IC₅₀ de 35 ± 12 nM y 37 ± 15 nM para los péptidos C4 y C2, respectivamente, en células Hela, de 58 ± 6 nM y 67 ± 15 nM para los péptidos C4 y C2, respectivamente, en MCF7, y de 78 ± 10 nM y 102 ± 24 nM para los péptidos C4 y C2, respectivamente, en HEK-2. Por el contrario, la proliferación solo se redujo entre un 10 y un 20% para fibroblastos HS68 no transformados, en perfecta consonancia con el impacto del punto de consigna G2-M de la proliferación de ciclo celular, y demostrando la especificidad del péptido por células cancerosas. La Figura 5 muestra un ejemplo con VEPEP-3a, VEPEP-3d y VEPEP-3g.
- 10
- 15 La disociación mediada por C2 y C4 de los complejos CDK2/ciclina A o CDK4/ciclina D se asoció directamente a la acumulación de células con un contenido 4N, consistente con la regulación a la baja de la actividad de Cdk1-Ciclina B1, y se obtuvo de forma óptima con 200 nM de péptido y con valores IC₅₀ estimados de 36 ± 21 nM y 46 ± 14 nM para células HeLa y MDA_MB, respectivamente (Figura 5). La Figura 4 muestra un ejemplo que emplea VEPEP-3a con C2 y C4 en una ratio molar de 1/20. Por el contrario, no se observó efecto sobre la progresión del ciclo celular con 500 nM de péptidos C2 codificados formando complejo con VEPEP-3a en una ratio de 20/1, o solo con vehículo de VEPEP-3a (200 µM).
- 20

Ejemplo 3.3: la administración mediada por VEPEP3 de péptidos dirigidos a integrasa de VIH bloquea la replicación de virus de VIH

- 25 Las actividades anti-VIH de los péptidos (PC4D, PC6D y PC4S) y de los complejos VEPEP-3/péptidos fueron ensayadas de acuerdo a un método descrito previamente (Roisin et al, 2004). Células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) activadas con fitohemaglutinina-P (PHA-P) tratadas con concentraciones crecientes de péptido (de 100 a 0,1 nM), una hora más tarde, fueron infectadas con cien dosis infecciosas de cultivo de tejido al 50% (TCID₅₀) por cada 100.000 células del VIH-1-LAI o diferentes cepas resistentes (Barre-Sinoussi et al, 1983). Los virus fueron amplificados *in vitro* en PBMC activadas con PHA-P. La reserva vírica fue valorada usando PBMC activadas con PHA-P, y se calculó la TCID₅₀ al 50% usando la fórmula de Kärber (Karber 1931). Las muestras se mantuvieron a lo largo del cultivo, y se recogieron los sobrenadantes celulares en el día 7 tras la infección y se almacenaron a -20°C. Se midió la replicación vírica cuantificando la actividad RT en los sobrenadantes de cultivo celular. En paralelo, se evaluó la citotoxicidad de los compuestos en PBMC activadas con PHA-P no infectadas mediante ensayo colorimétrico de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil tetrazolio (MTT) el día 7 (Mossmann 1983). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y se repitieron con otro donante de sangre. El análisis de datos se llevó a cabo usando el software de microcomputadora SoftMax®Pro 4.6: se representó el porcentaje de inhibición de actividad RT o de viabilidad celular frente a la concentración, y se ajustó con curvas cuadráticas; se calcularon las dosis efectivas al 50% (ED₅₀) y las dosis citotóxicas (CD₅₀).
- 30
- 35 Los experimentos de dosis-respuesta llevados a cabo con células cultivadas revelaron que la administración de PC4D y PC6D mediada por VEPEP-3a, VEPEP-3c y VEPEP-3g bloquea de forma significativa la replicación en PBMC infectadas con VIH-1_{LAI} (Figura 3). Cuando se asocian al péptido vehículo VEPEP-3, PC4D y PC6D exhiben una actividad antivírica 15 veces mayor que el AZT, que es el inhibidor RT de referencia usando en la práctica clínica: IC₅₀ de 0,12 ± 0,05 nM y 0,09 ± 0,05 nM, respectivamente. Por el contrario, los péptidos cifrados PC4S y PC6S no muestran ninguna actividad antivírica. Ninguno de los complejos VEPEP-3/péptido induce una respuesta tóxica y presentan un índice de selectividad superior a 5400, lo cual es 10 veces más que el AZT.
- 40
- 45

Ejemplo 3.4: administración mediada por VEPEP-3 de proteínas en diferentes líneas celulares

Se han usado VEPEP-3 para la administración de diferentes proteínas a diferentes líneas celulares, que incluyen líneas celulares primarias, líneas de células madre y líneas celulares de exposición. Se monitorizó la captación de

proteínas usando espectroscopía de fluorescencia y análisis FACS. Las proteínas GFP/RFP o las proteínas marcadas fluorescentes fueron visualizadas en las diferentes líneas celulares usando microscopía de fluorescencia o clasificación FACS (Tabla 3). En la mayoría de las líneas celulares, la captación de RFP; GFP, proteínas marcadas con Cy-5 es superior al 70% de las células.

Líneas celulares	Origen	Eficiencia GFP	Eficiencia proteína-Cy
Hela	Células de cáncer cervical epitelial humano	67%	90%
Jurkat	Linfocito T humano	80%	90%
HepG2	Hepatocito humano	69%	70%
C2C12	Mioblasto de ratón	80%	90%
MEF	Fibroblasto de ratón	75%	90%
HS-68	Fibroblasto humano	80%	90%
CEM-SS	Macrófago humano	80%	80%
U2OS	Osteoblasto humano	70%	91%
MCF7	Adenocarcinoma de mama humano	65%	70%
MT4	Linfocito T humano	50%	55%

Tabla 3

Ejemplo 3.5: la administración mediada por VEPEP3 de péptidos y proteínas no es tóxica.

Tal como se muestra en la Figura 6, se investigó la toxicidad de partículas VEPEP-3 en células HeLa y U2OS mediante ensayo MTT y monitorizando el nivel de ARNm de ciclofilina medido mediante tecnología quantigen™ (Affymetrix). Se formaron complejos de VEPEP-3a, VEPEP-3b, VEPEP-3c, VEPEP-3d, VEPEP-3e, VEPEP-3f, VEPEP-3g y VEPEP-3h con péptido corto y PNA en una ratio 1/20. No se detectó toxicidad en niveles de hasta 200 nM, y solo se observó una toxicidad moderada en la concentración máxima de 1 μ M.

Ejemplo 3.6: administración mediada por VEPEP-3 de molécula de PNA en diferentes líneas celulares

Se han usado péptidos VEPEP-3 para la administración de análogos de ácido nucleico (PNA y morfolino) a diferentes líneas celulares, que incluyen líneas celulares primarias y líneas celulares de exposición. Hemos demostrado que VEPEP-3a y VEPEP-3h forman complejos estables con PNA pequeños o con oligonucleótido de morfolino de 15 monómeros. Hemos aplicado la estrategia VEPEP-3 a la administración de Ciclina B1 dirigida a PNA antisentido como se ha descrito previamente (Morris et al, 2007). Los experimentos dosis-respuesta llevados a cabo con diferentes células cultivadas revelaron que la administración mediada por VEPEP-3 de PNA (Ciclina B1) indujo una regulación a la baja robusta superior al 70% del nivel de proteína Ciclina B1 (Figura 7).

Ejemplo 3.7: Administración mediada por VEPEP-3 de moléculas hidrofóbicas pequeñas en diferentes líneas celulares

Se han usado péptidos VEPEP-3 para la administración de diferentes moléculas hidrofóbicas fluorescentes pequeñas y cargadas, así como doxorrubicina/porfirina/taxol en diferentes líneas celulares, que incluyen líneas celulares primarias y líneas celulares de exposición. Los péptidos VEPEP-3 forman partículas estables con moléculas aromáticas pequeñas que incluyen doxorrubicina o colorantes fluorescentes. La constante de disociación correspondiente a moléculas hidrofóbicas pequeñas oscila entre 0,01 y 2 μ M, dependiendo de la naturaleza de los colorantes y de los péptidos.

El efecto de la administración mediada por VEPEP-3a, VEPEP-3c y VEPEP-3g de doxorrubicina, porfirina o taxol ha sido investigado en la viabilidad de células cancerosas. Experimentos dosis-respuesta llevados a cabo en cultivos celulares revelaron que la administración mediada por péptido VEPEP-3 de doxorrubicina y porfirina inducía una respuesta biológica asociada al arresto del ciclo celular y a una disminución de la viabilidad de células cancerosas MCF-7 y SCK-3-HEK-2 (la Figura 8 muestra los resultados obtenidos con células MCF-7). El impacto de péptidos vehículo para mejorar la captación celular de fármacos de molécula pequeña se estimó siguiendo la inhibición de la proliferación de células cancerosas.

En la Tabla 4 se presentan los valores de IC₅₀. Para VEPEP-3/Doxo y Doxo libre se obtuvo una IC₅₀ de 0,4 μ M y 10 μ M, respectivamente. Los datos demuestran que la Doxo es 25 veces más eficiente cuando se encuentra formando un complejo con VEPEP-3.

Fármaco	VEPEP-3a 1/20 IC ₅₀ (μ M)	Fármaco libre IC ₅₀ (μ M)	VEPEP-3c 1/20 IC ₅₀ (μ M)	VEPEP-3g 1/20 IC ₅₀ (μ M)
---------	--	--	--	--

Doxo (SKB3)	0,3	10	0,4	0,2
Doxo (MCF7)	0,2	7	0,5	0,2
Porfirina (MCF7)	0,8	25	1,7	0,5
Porfirina (SKB3)	1,5	17	2,4	1,2
Taxol (MCF7)	0,2	7	0,5	0,7
Taxol (SKB3)	0,5	9	0,9	0,8

Tabla 4

Ejemplo 4: formulaciones NANOPEP-3 y aplicaciones para administración *in vivo*

Las nanopartículas NANOPEP contienen un “péptido-núcleo” o “envoltura de núcleo” que corresponde a la asociación de péptido VEPEP-3 o de cualquier otro péptido que forme complejos no covalentes con su respectiva carga, que está rodeado por péptidos adicionales VEPEP-3 “periféricos” que estabilizan la partícula y favorecen la asociación a la membrana celular. La eficacia de NANOPEP viene controlada principalmente por el tamaño y la carga eléctrica de las partículas, que deberían oscilar entre 100 – 200 nm y +5 - +20 voltios, respectivamente. Se pueden usar varias combinaciones para el VEPEP-3 de “núcleo”, y periférico puede estar funcionalizado o no. La elección de los péptidos del “núcleo” depende de la naturaleza de las cargas y puede ser VEPEP-6, un péptido de otra familia VEPEP (VEPEP-9,...), CADY (Crombez et al, 2009a [10]), MPG (Crombez et al, 2009b [11]) o PEP-1 (Chariot: Morris et al, 2001 [8]), etc.

Las partículas NANOPEP se forman en un proceso de dos etapas (Figura 9): primero el “núcleo” en una ratio molar de 1/5 o 1/10, después el “periférico” en una ratio molar de 1/20 hasta 1/80. La organización multicapa de la partícula permite su funcionalización orientada, que se elegirá dependiendo de la naturaleza de la diana celular/tejido y del modo de administración.

Se ha establecido un protocolo de tres etapas (Figura 9) cuando tiene lugar la funcionalización de la partícula a través de ácido nitrilotriacético (NTA) ligado al VEPEP-3. Es bien sabido que el grupo NTA es capaz de quelar metal e interaccionar fuertemente con proteínas marcadas con histidina. El recubrimiento de las partículas con VEPEP-3 funcionalizado con NTA permite la unión de cualquier proteína que alberga una etiqueta de histidina a la partícula. Esta estrategia ofrece la ventaja principal de presentar partículas comunes de 2 capas “NANOPEPHIS” que pueden asociarse a cualquier proteína marcada con His. La estrategia de NANOPEPHIS ha sido usada para recubrir partículas con anticuerpos específicos dirigidos a antígeno de superficie celular (EGF, HER-2 o MUC1) o a nanocuerpos seleccionados mediante presentación de fagos contra líneas celulares específicas para administración de péptidos. La estrategia NANOPEPHIS-3 puede aplicarse universalmente a cualquier péptido o proteína que albergue una agrupación de Histidina en su secuencia.

Ejemplo 5: aplicaciones de la estrategia NANOPEP-3

Se ha usado la estrategia NANOPEP-3 para la administración y ataque dirigido *in vitro* de diferentes cargas y diferentes nanopartículas basadas en péptidos. A continuación se presentan diferentes ejemplos de aplicaciones de NANOPEP-3.

Ejemplo 5.1: administración dirigida *in vivo* de péptido corto mediada por NANOPEP-3 tras inyecciones sistémicas intravenosas o tópicas

El potencial terapéutico de la tecnología NANOPEP-3 ha sido validado *in vivo* con péptidos dirigidos a CDK2/CICLINA A/E y CDK4/CICLINA D, proteína quinasas esenciales requeridas para el control la progresión del ciclo celular en G1 y G2, y dianas terapéuticas establecidas en varios cánceres. La potencia de esta tecnología ha sido validada *in vivo* con péptidos dirigidos a interacciones entre proteína quinasas y sus reguladores de ciclina, requeridos para la entrada y la progresión a través de mitosis. Los inventores han demostrado que la combinación de un péptido C4 o C2 con NANOPEP previene el crecimiento de tumor de pulmón y próstata en modelos de xenoinjerto de ratón, tras inyección cada tres días de NANOPEP-3/C4 y NANOPEP-3/C2 en una dosis de 1 mg/kg (Figura 10). La envoltura de “núcleo” de las partículas se formó usando péptido VEPEP-3a o VEPEP-3f en una ratio molar de 20/1 o 40/1 con un péptido C4 o C2. Los péptidos VEPEP-3 fueron solubilizados en agua y la disolución de reserva de péptido fue sometida a ultrasonidos durante 10 minutos en un baño de agua antes de la formación de complejos. A continuación se formaron los complejos VEPEP-3/péptido añadiendo péptido (C2 o C4) en la disolución de péptido e incubando a 37°C durante 20-30 minutos para permitir que se formaran los complejos vehículo de péptido/péptido. Entonces se recubrieron las partículas con péptidos VEPEP-3a (NANO-3A) o VEPEP-3f (NANO-3F) dependiendo de la diana *in vivo*. El recubrimiento se llevó a cabo añadiendo el péptido de recubrimiento en una ratio molar (péptido/péptido) de 1/5 e incubando después durante 20 minutos a 37°C para obtener complejos estables, tal como se muestra en la Figura 9. Las disoluciones de reserva de partículas se llevaron a cabo en agua y son estables durante al menos tres semanas a 4°C. Las partículas pueden liofilizarse para almacenamiento a largo plazo; en cuyo caso se añade entre un 5 y un 20% de glucosa o manitol a la disolución de partículas antes de la

lío-filización para estabilizar las partículas durante el proceso. Antes de la administración, las partículas son diluidas en condiciones fisiológicas, en presencia de: 0,9% de NaCl y de 5 a 20% de glucosa o manitol.

Administración de NANOPEP-3/C4 y NANOPEP-3/C2 tras inyección tópica y sistémica

El potencial de NANOPEP-3 para administrar péptidos C2 o C4 *in vivo* se evaluó primeramente en ratones con xenoinjertos PC3 de célula de carcinoma de próstata humana (Figura 10). Se evaluó el efecto de la administración intratumoral local e intravenosa de partículas NANOPEP-3/C4 o NANOPEP-3/C2 (ratio molar 20/1) sobre el crecimiento de tumores subcutáneos establecidos. En el día 50, el tamaño de los tumores de la cohorte de control, inyectada con PBS, habían aumentado aproximadamente 4,1 veces. Tras un tratamiento intratumoral local, se observaron reducciones del crecimiento tumoral del 75% y el 80% usando 100 µg (0,5 mg/kg) de C4/NANOPEP-3a o 3f y de C2/NANOPEP-3a o 3f, el crecimiento tumoral se evitó completamente con 500 µg (1 mg/kg) de C2/NANOPEP-3a o 3f y C4/NANOPEP-3a o 3f, respectivamente (Figura 10). Tras la administración intravenosa sistémica, se observaron reducciones del crecimiento tumoral del 45% y del 47% usando 500 µg (1 mg/kg) de C4/NANOPEP-3 y C2/NANOPEP-3, respectivamente. En ambos casos, la inhibición del crecimiento tumoral fue específica de secuencia de C4 o C2, ya que el péptido C4S codificado acompañado con NANOPEP-3 e inyectado en ratones en una dosis de 2 mg/kg fue incapaz de inhibir el crecimiento tumoral. Los resultados demostraron que las partículas NANOPEP-3 son menos eficientes por inyección sistémica, lo que probablemente es debido a una menor estabilidad de la partícula en el torrente sanguíneo (ver más adelante).

Administración de péptido C2 y C4 mediada por NANOPEP-3 tras inyección sistémica

La estabilidad de las formulaciones vehículo de fármacos *in vivo* y en la circulación sanguínea es algo crítico para la administración sistémica de agentes terapéuticos. A fin de mejorar la biodisponibilidad y la estabilidad de las partículas de NANOPEP-3a/péptido, éstas se recubrieron con PEG-VEPEP-3a, haciéndolas de este modo más adecuadas para administración sistémica; la capa superficial de las partículas NANOPEP-3a se funcionalizó con un resto PEG en el extremo N de VEPEP-3 (PEG-VEPEP-3a), mediante activación del grupo amino de la beta alanina N-terminal. Las partículas NANOPEP-3a/C4 PEGiladas fueron obtenidas paso a paso formando complejos de las moléculas VEPEP-3 con C4 en una ratio molar de 15/1, seguido de un recubrimiento de las partículas con una segunda capa de PEG-VEPEP3a en una ratio de 1/10. Con el objetivo de analizar si el aumento de la distribución de péptido C4 asociado a partículas NANOPEP-3a funcionalizadas afecta directamente a su potencia para inhibir el crecimiento tumoral, las partículas fueron usadas en administración intravenosa sistémica en un modelo de ratón de tumor de xenoinjerto SKB3-HEK2. Se inyectaron intravenosamente cada tres días 100 µg (0,5 mg/kg) de péptido C4 formando complejo con PEG-NANOPEP-3 en una ratio de 1/30 a ratones portadores de tumor de xenoinjerto SKB3-HEK2, y se observó una reducción significativa del tamaño del tumor del 90% en el día 50 (Figura 11), lo cual es 10 veces más potente que con la nanopartícula NANOPEP-3 no funcionalizada, lo que sugiere que el PEG- incrementa la biodistribución de péptido en el tumor manteniendo péptido en el plasma y estabilizando la partícula de NANOPEP-3.

Ejemplo 5.2: administración antisentido de PNA B1 anticiclina mediada por NANOPEP-3 tras inyección sistémica.

Se usó NANOPEP-3 para la administración *in vivo* de ciclina B1 antisentido dirigida a PNA antisentido. Se evaluaron partículas NANOPEP-3H/PNA, NANOPEP-3A/PNA libres o recubiertas con PEG-VEPEP-3A directamente para determinar la potencia de inhibición del crecimiento tumoral; las partículas fueron usadas para administración intravenosa sistémica en un modelo de ratón de tumor de xenoinjerto SKB3-HEK2. En las últimas, la capa superficial de partículas NANOPEP-3 estaba funcionalizada con un resto PEG en el extremo N de VEPEP-3A (PEG-VEPEP-3a), a través de la activación del grupo amino de la beta alanina N-terminal. Las partículas PEGiladas NANOPEP-3/PNA fueron obtenidas por etapas formando complejos de moléculas VEPEP-3 con PNA en una ratio molar de 10/1, seguido del recubrimiento de las partículas con una segunda capa de PEG-VEPEP3 en una ratio de 1/10. Se inyectaron intravenosamente cada tres días 5 µg (0,1 mg/kg) y 10 µg de PNA acompañado con NANOPEP-3 y PEG-NANOPEP-3 en una ratio 1/30 en ratones portadores de tumor de xenoinjerto SKB3-HEK2. Como se muestra en la Figura 12, en el día 50, se obtuvieron reducciones del crecimiento tumoral del 20 y el 43% con 5 µg y 10 µg de PNA acompañado con NANOPEP-3, respectivamente. Se observó una reducción significativa del tamaño tumoral del 90% con 5 µg de PNA acompañado con PEG-NANOPEP-3, en el día 50 (Figura 12). La inhibición del crecimiento tumoral fue específica de la secuencia de ciclina B1 de PNA ya que 50 µg de PNA codificado acompañado con NANOPEP-3 e inyectados en ratones fueron incapaces de inhibir el crecimiento tumoral. Estos resultados sugieren que el VEPEP-3 es un gran vehículo para la administración *in vivo* de PNA y que el PEG- aumenta la biodistribución de PNA en el tumor mejorando la estabilidad de la partícula NANOPEP-3.

Ejemplo 5.3: ataque dirigido a péptido cerebral *in vivo* mediado por NANOPEP-3

Se usaron péptidos VEPEP-3 para promover el ataque dirigido a cerebro de nanopartículas basadas en péptido. Se usó VEPEP-3 como vehículo y se recubrió con VEPEP-3 para ataque a cerebro. También se añadió péptido VEPEP-3 como péptido de recubrimiento en otros complejos de carga de nanopartículas basados en péptidos (que incluyen "partículas de envoltura de núcleo" de otras familias VEPEP, CADY, PEP o MPG/péptido). Las cargas usadas fueron un péptido marcado fluorescentemente o siARN. Las partículas fueron formadas como se muestra en la Figura 9. En

todos los casos se inyectaron intravenosamente 5 µg de cargas acomplejadas con péptido vehículo. A continuación se monitorizó la biodistribución *in vivo* de las cargas usando imágenes de fluorescencia en animales vivos. El VEPEP-3/péptido da como resultado una gran acumulación de Péptido en el cerebro (Figura 13), y la presencia de recubrimiento de VEPEP-3 indujo un aumento de la administración de carga (péptido o siARN) en el cerebro. La monitorización de la fluorescencia de cargas marcadas mostró un aumento de 5 a 10 veces en el cerebro, en comparación con los experimentos de control en ausencia de recubrimiento VEPEP-3 de la partícula. La presencia de recubrimiento VEPEP-3 también aumentó en un factor de 3 veces el bloqueo de GADPDH en el cerebro (Figura 13). En conjunto estos resultados demostraron que el péptido VEPEP-3 mejora significativamente el ataque dirigido a cerebro de nanopartículas basadas en péptidos, y que puede usarse para ataques dirigidos a cerebro tanto como vehículo o como capa de recubrimiento de nanopartículas basadas en péptidos ya formadas.

Ejemplo 5.4: administración in vivo mediada por NANOPEP-3 de cargas a través de diferentes rutas de administración

Se han evaluado nanopartículas basadas en NANOPEP-3 usando diferentes rutas de administración que incluyen administraciones sistémicas intravenosa, intrarrectal, intranasal y transdérmica.

Se formó un complejo de péptido o proteína (nanocuerpo pequeño) marcado fluorescentemente con Alexa 700 con partículas NANOPEP-3. Se evaluó la biodistribución del péptido/proteína marcado fluorescentemente *in vivo* en ratones Balb6, 5 h después de una única administración de 10 µg de péptido o proteína en partículas NANOPEP-3. Las administraciones intravenosa e intrarrectal del complejo NANOPEP-3/péptido o NANOPEP-3/proteína permitieron la administración del péptido en la mayoría de los tejidos analizados, con una administración significativa en el cerebro y los ganglios (Figuras 14 A-B). Para la proteína, la administración fue principalmente en el pulmón, hígado, riñón, cerebro y nodos linfáticos. Las administraciones intranasal e intratraqueal permitieron la administración del péptido principalmente en el cerebro, pulmón, hígado, páncreas y riñón, y de la proteína en el pulmón, hígado y cerebro. Finalmente, la administración transdérmica se limita a la administración de péptido y la proteína a través y en piel y músculos, pero no en los otros tejidos (Figuras 14 C-D).

REFERENCIAS

- [1] DJ. Glover, HJ. Lipps, DA. Jans, Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat. Rev. Genet.* 6 (2005) 299-310.
- 5 [2] KA. Whitehead, R. Langer, DG. Anderson, Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 8 (2009) 129-138.
- [3] Ü Langel, *Handbook of Cell-Penetrating Peptides* : (Eds.: U. Langel) CRC Taylor & Francis, Boca Raton (2007).
- [4] F. Heitz, MC. Morris, G. Divita, Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics; *British Journal of Pharmacology* 157 (2009) 195-206.
- 10 [5] S. Deshayes, MC. Morris, F. Heitz, G. Divita. Delivery of proteins and nucleic acids using a non-covalent peptide-based strategy. *Adv Drug Deliv Rev.* 60 (2008) 537-547.
- [6] S. Deshayes, MC. Morris, G. Divita, F. Heitz Cell-penetrating peptides: tolos for intracellular delivery of therapeutics, *Cell Mol Life Sci.* 62 (2005) 1839-1849.
- [7] MC. Morris, P. Vidal, L. Chaloin, F. Heitz, G. Divita A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 2730-2736.
- 15 [8] MC. Morris, J. Depollier, J. Mery, F. Heitz, G. Divita A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells, *Nat. Biotechnol.* 19 (2001) 1173-1176.
- [9] Mery J, Brugidou J, Derancourt J. Disulfide bond as peptide-resin linkage in Boc-Bzl SPPS, for potential biochemical applications, *Pept Res.* 1992 Jul-Aug;5(4):233-40.
- 20 [10] L. Crombez, M.C. Morris, S. Dufort, G. Aldrian-Herrada, Q. Nguyen, G. Mc Master, J.L. Coll, F. Heitz, G. Divita, Targeting cyclin B1 through peptide-based delivery of siRNA prevents tumour growth, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 4559-4569.
- [11] L. Crombez, G. Aldrian-Herrada, K. Konate, Q.N. Nguyen, G.K. McMaster, R. Brasseur, F. Heitz, G. Divita, A new potent secondary amphipathic cell-penetrating peptide for siRNA delivery into mammalian cells, *Mol. Ther.* 17 (2009) 95-103.
- 25 [12] Verdine, G.L. and Hilinski, G.J. (2012), Stapled peptides for intracellular drug targets. *Methods in Enzymology*, vol 503, p3-33.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
DIVITA, Gilles
5 DESHAYES , Sébastien
KONATE , Karidia
MORRIS, May Catherine

<120> PÉPTIDOS DE PENETRACIÓN CELULAR PARA ADMINISTRACIÓN INTRACELULAR DE MOLÉCULAS

10 <130> ELMAbrvi-F644/355WO1

<160> 52

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 16
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
<223> VEPEP-3a

25 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
<222> (1)..(1)
<223> X = beta-A o S

30 <400> 1
Xaa Lys Trp Phe Glu Arg Trp Phe Arg Glu Trp Pro Arg Lys Arg Arg
1 5 10 15

<210> 2
<211> 16
35 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VEPEP-3b

40 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
<222> (1)..(1)
<223> X = beta-A o S

45 <400> 2
Xaa Lys Trp Trp Glu Arg Trp Trp Arg Glu Trp Pro Arg Lys Arg Lys
1 5 10 15

<210> 3
50 <211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
55 <223> VEPEP-3c

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
<222> (1)..(1)
60 <223> X = beta-A o S

<400> 3

Xaa Arg Trp Trp Glu Lys Trp Trp Thr Arg Trp Pro Arg Lys Arg Lys
 1 5 10 15
 <210> 4
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VEPEP-3d
 10
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = beta-A o S
 15
 <400> 4
 Xaa Arg Trp Tyr Glu Lys Trp Tyr Thr Glu Phe Pro Arg Arg Arg Arg
 1 5 10 15
 <210> 5
 20 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> VEPEP-3e
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (1)..(1)
 30 <223> X = beta-A o S
 <400> 5
 Xaa Arg Trp Trp Arg Leu Trp Trp Arg Ser Trp Phe Arg Leu Trp Arg
 1 5 10 15
 Arg
 35 <210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> VEPEP-3f
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 45 <222> (1)..(1)
 <223> X = beta-A o S
 <400> 6
 Xaa Leu Trp Trp Arg Arg Trp Trp Ser Arg Trp Trp Pro Arg Trp Arg
 1 5 10 15
 Arg
 50 <210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> VEPEP-3h

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (1)..(1)
 5 <223> X = beta-A o S

 <400> 7
 Xaa Lys Phe Trp Ser Arg Phe Trp Arg Ser Trp Phe Arg Leu Trp Arg
 1 5 10 15

 Arg
 10 <210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> VEPEP-3g

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 20 <222> (1)..(1)
 <223> X = beta-A o S

 <400> 8
 Xaa Leu Trp Trp Ser Arg Trp Trp Arg Ser Trp Phe Arg Leu Trp Phe
 1 5 10 15

 Arg
 25 <210> 9
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> VEPEP-3bstapl

 <220>
 35 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = beta-A o S

 <220>
 40 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (3)..(3)
 <223> X = aminoácido no-natural usado para la unión de un grapado hidrocarbonada

 <220>
 45 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

 <400> 9
 Xaa Lys Xaa Trp Trp Glu Arg Trp Trp Arg Xaa Trp Pro Arg Lys Arg
 1 5 10 15

 50 Lys

 <210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 55 <213> Artificial

<220>
<223> VEPEP-3estap

5 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
<222> (1)..(1)
<223> X = beta-A o S

10 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
<222> (5)..(5)
<223> X = aminoácido no-natural usado para la unión de un grapado hidrocarbonada

15 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
<222> (12)..(12)
<223> X = aminoácido no-natural usado para la unión de un grapado hidrocarbonada

20 <400> 10
Xaa Arg Trp Trp Xaa Leu Trp Trp Arg Ser Trp Xaa Arg Leu Trp Arg
1 5 10 15

Arg

<210> 11
<211> 17
25 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VEPEP-3

30 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
<222> (1)..(1)
<223> X = beta-A o S

35 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
<222> (2)..(2)
<223> X = K, R o L

40 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
<222> (3)..(3)
<223> X = F o W

45 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
<222> (4)..(4)
<223> X = F, W o Y

50 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
<222> (5)..(5)
<223> X = E, R o S

55 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
<222> (6)..(6)
<223> X = K, R o L

60 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA

<222> (7)..(7)
 <223> X = F o W

5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (8)..(8)
 <223> X = F, W o Y

10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (9)..(9)
 <223> X = R, T o S

15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (10)..(10)
 <223> X = E, R o S

20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (11)..(11)
 <223> X = F o W

25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (12)..(12)
 <223> X = none, F o W

30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (13)..(13)
 <223> X = P o R

35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (14)..(14)
 <223> X = R o L

40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (15)..(15)
 <223> X = K, W o R

45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (16)..(16)
 <223> X = R o F

50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (17)..(17)
 <223> X = R o K

<400> 11
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

55 Xaa

<210> 12
 <211> 16
 <212> PRT

60 <213> Artificial

<220>

<223> VEPEP-3a-d
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 5 <222> (1)..(1)
 <223> X = beta-A o S
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 10 <222> (2)..(2)
 <223> X = R o K
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 15 <222> (4)..(4)
 <223> X = F, W o Y
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 20 <222> (6)..(6)
 <223> X = R o K
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 25 <222> (8)..(8)
 <223> X = F, W o Y
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 30 <222> (9)..(9)
 <223> X = T o R
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 35 <222> (10)..(10)
 <223> X = E o R
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 40 <222> (11)..(11)
 <223> X = W o F
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 45 <222> (14)..(14)
 <223> X = R o K
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 50 <222> (16)..(16)
 <223> X = R o K
 <400> 12
 Xaa Xaa Trp Xaa Glu Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Arg Xaa Arg Xaa
 55 1 5 10 15
 <210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> VEPEP-3e-h
 <220>
 65 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA

<222> (1)..(1)
 <223> X = beta-A o S

 <220>
 5 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (2)..(2)
 <223> X = K, R o L

 <220>
 10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (3)..(3)
 <223> X = F o W

 <220>
 15 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (5)..(5)
 <223> X = R o S

 <220>
 20 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (6)..(6)
 <223> X = L o R

 <220>
 25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (7)..(7)
 <223> X = F o W

 <220>
 30 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (9)..(9)
 <223> X = R o S

 <220>
 35 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (10)..(10)
 <223> X = R o S

 <220>
 40 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (12)..(12)
 <223> X = F o W

 <220>
 45 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (13)..(13)
 <223> X = R o P

 <220>
 50 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (14)..(14)
 <223> X = L o R

 <220>
 55 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (16)..(16)
 <223> X = R o F

 <400> 13
 60 Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Trp Xaa

1

5

10

15

Arg

5 <210> 14
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> VEPEP-3-Funct-1

 10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = Colesterol, Pegilación, estearilo, palmitoilo, fragmentos de FC o FAB pequeños, nanocuerpo, ácido nitrilotriacético (2 x NTA), o péptidos para dianas de tejidos

 15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (18)..(18)
 <223> X = CH₂-CH₂-SH

 20 <400> 14
 Xaa Leu Trp Trp Arg Arg Trp Trp Ser Arg Trp Trp Pro Arg Trp Arg
 1 5 10 15

 Arg Xaa

 25 <210> 15
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> VEPEP-3-Funct-2

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (1)..(1)
 35 <223> X = un acetilo

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (18)..(18)
 40 <223> X = CH₂-CH₂-S-S-Z, con Z = Colesterol, Pegilación, estearilo, palmitoilo, fragmentos de FC o FAB pequeños, nanocuerpo, ácido nitrilotriacético (2 x NTA), o péptidos para dianas de tejidos

 <400> 15
 Xaa Leu Trp Trp Arg Arg Trp Trp Ser Arg Trp Trp Pro Arg Trp Arg
 1 5 10 15
 45 Arg Xaa

 <210> 16
 <211> 11
 50 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> VEPEP-3-Funct-3

 55 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = Colesterol, Pegilación, estearilo, palmitoilo, fragmentos de FC o FAB pequeños, nanocuerpo, ácido nitrilotriacético (2 x NTA), o péptidos para dianas de tejidos

 60

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (3)..(3)
 5 <223> X = W o F

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (7)..(7)
 10 <223> X = W o F

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (11)..(11)
 15 <223> X = CH₂-CH₂-SH

<400> 16
 Xaa Trp Xaa Arg Leu Trp Xaa Arg Leu Arg Xaa
 1 5 10

20 <210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> VEPEP-3-Funct-4

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 30 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 35 <222> (3)..(3)
 <223> X = W o F

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 40 <222> (7)..(7)
 <223> X = W o F

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 45 <222> (11)..(11)
 <223> X = CH₂-CH₂-S-S-Z, with Z = Colesterol, Pegilación, estearilo, palmitoilo, fragmentos de FC o FAB pequeños, nanocuerpo, ácido nitrilotriacético (2 x NTA), o péptidos para dianas de tejidos

<400> 17
 Xaa Trp Xaa Arg Leu Trp Xaa Arg Leu Arg Xaa
 50 1 5 10

<210> 18
 <211> 18
 <212> DNA
 55 <213> Artificial

<220>
 <223> Cyc-B1a

60 <400> 18
 tgccatcgagg cttggagg 18

<210> 19
 <211> 18

<212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Cyc-Bct

 <400> 19
 tgccatcaag ctagagg 18

 10 <210> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> C2

 <400> 20
 Lys Lys Gln Val Leu Ala Met Glu His Leu Val Thr
 1 5 10
 20 <210> 21
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> C2S

 <400> 21
 Val Thr Leu Met Glu Ala Lys Lys Gln Val Leu Thr
 30 1 5 10

 <210> 22
 <211> 12
 <212> PRT
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> C4

 40 <400> 22
 Lys Lys Gln Val Arg Met Ala His Leu Val Leu Thr
 1 5 10

 <210> 23
 <211> 14
 45 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> C4C
 50
 <400> 23
 Cys Lys Lys Gln Val Arg Met Ala His Leu Val Leu Thr Cys
 1 5 10

 <210> 24
 55 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> PC4

 <400> 24

Arg Trp Thr Glu Trp Glu Trp Trp
 1 5
 <210> 25
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> PC4S
 10
 <400> 25
 Thr Trp Phe Thr Glu Trp Phe Thr
 1 5
 <210> 26
 15 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> PC6
 <400> 26
 Lys Trp Glu Thr Trp Trp Glu Thr
 1 5
 25 <210> 27
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> PC6S
 <400> 27
 Lys Ala Glu Thr Trp Ala Glu Thr
 1 5
 35 <210> 28
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> CADY-1
 <220>
 45 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo
 <220>
 50 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (22)..(22)
 <223> X = cisteamida
 <400> 28
 Xaa Gly Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg
 1 5 10 15
 55 Leu Leu Trp Lys Ala Xaa
 20
 <210> 29
 <211> 21

<212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> VEPEP-6a

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (1)..(1)
 10 <223> X = un acetilo

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (2)..(2)
 15 <223> X = beta-A o S

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (21)..(21)
 20 <223> X = cisteamida

 <400> 29
 Xaa Xaa Leu Phe Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg
 1 5 10 15

 Leu Leu Trp Lys Xaa
 20

 25 <210> 30
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial

 30 <220>
 <223> VEPEP-6b

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 35 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 40 <222> (2)..(2)
 <223> X = beta-A o S

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 45 <222> (22)..(22)
 <223> X = cisteamida

 <400> 30
 Xaa Xaa Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Trp Arg Ser Leu Trp Arg
 1 5 10 15

 Leu Leu Trp Lys Ala Xaa
 20

 50 <210> 31
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial

 55 <220>
 <223> VEPEP-6c

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (1)..(1)
 5 <223> X = un acetilo

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (2)..(2)
 10 <223> X = beta-A o S

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (22)..(22)
 15 <223> X = cisteamida

<400> 31
 Xaa Xaa Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg
 1 5 10 15

Leu Trp Arg Lys Ala Xaa
 20

20 <210> 32
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> VEPEP-6d

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 30 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 35 <222> (2)..(2)
 <223> X = beta-A o S

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 40 <222> (22)..(22)
 <223> X = cisteamida

<400> 32
 Xaa Xaa Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Trp Arg Ser Leu Trp Arg
 1 5 10 15

Leu Trp Arg Lys Ala Xaa
 45 20

<210> 33
 <211> 22
 50 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> VEPEP-6e
 55

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA

<222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo

5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (2)..(2)
 <223> X = beta-A o S

10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (22)..(22)
 <223> X = cisteamida

<400> 33
 Xaa Xaa Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Ala Leu Trp Arg
 1 5 10 15

15 Leu Leu Trp Lys Ala Xaa
 20

<210> 34
 <211> 22
 <212> PRT
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> VEPEP-6f

25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo

30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (2)..(2)
 <223> X = beta-A o S

35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (22)..(22)
 <223> X = cisteamida

40 <400> 34
 -
 Xaa Xaa Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Asn Leu Trp Arg
 1 5 10 15

Leu Leu Trp Lys Ala Xaa
 20

<210> 35
 <211> 22
 45 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> VEPEP-9a1

50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo

55 <220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (2)..(2)
 <223> X = beta-A o S

5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (22)..(22)
 <223> X = cisteamida

10 <400> 35
 Xaa Xaa Leu Arg Trp Trp Leu Arg Trp Ala Ser Arg Trp Phe Ser Arg
 1 5 10 15

 Trp Ala Trp Trp Arg Xaa
 20

<210> 36
 <211> 22
 15 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> VEPEP-9a2

20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo

25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (2)..(2)
 <223> X = beta-A o S

30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (22)..(22)
 <223> X = cisteamida

35 <400> 36
 Xaa Xaa Leu Arg Trp Trp Leu Arg Trp Ala Ser Arg Trp Ala Ser Arg
 1 5 10 15

 Trp Ala Trp Phe Arg Xaa
 20

40 <210> 37
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 45 <223> VEPEP-9b1

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (1)..(1)
 50 <223> X = un acetilo

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (2)..(2)
 55 <223> X = beta-A o S

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (21)..(21)
 <223> X = cisteamida

5 <400> 37
 Xaa Xaa Arg Trp Trp Leu Arg Trp Ala Ser Arg Trp Ala Leu Ser Trp
 1 5 10 15

Arg Trp Trp Arg Xaa
 20

<210> 38
 <211> 21
 10 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> VEPEP-9b2

15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo

20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (2)..(2)
 <223> X = beta-A o S

25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (21)..(21)
 <223> X = cisteamida

30 <400> 38
 Xaa Xaa Arg Trp Trp Leu Arg Trp Ala Ser Arg Trp Phe Leu Ser Trp
 1 5 10 15

Arg Trp Trp Arg Xaa
 20

35 <210> 39
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 40 <223> VEPEP-9c1

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (1)..(1)
 45 <223> X = un acetilo

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (2)..(2)
 50 <223> X = beta-A o S

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (21)..(21)
 55 <223> X = cisteamida

<400> 39

Xaa Xaa Arg Trp Trp Leu Arg Trp Ala Pro Arg Trp Phe Pro Ser Trp
1 5 10 15

Arg Trp Trp Arg Xaa
20

<210> 40

<211> 21

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> VEPEP-9c2

10

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA

<222> (1)..(1)

<223> X = un acetilo

15

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA

<222> (2)..(2)

<223> X = beta-A o S

20

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA

<222> (21) .. (21)

<223> X = cisteamida

25

<400> 40

Xaa Xaa Arg Trp Trp Leu Arg Trp Ala Ser Arg Trp Ala Pro Ser Trp
1 5 10 15

Arg Trp Trp Arg Xaa
20

<210> 41

30 <211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> VEPEP-9d

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA

<222> (1)..(1)

40 <223> X = un acetilo

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA

<222> (2)..(2)

45 <223> X = beta-A o S

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA

<222> (17)..(17)

50 <223> X = cisteamida

<400> 41

Xaa Xaa Trp Trp Arg Trp Trp Ala Ser Trp Ala Arg Ser Trp Trp Arg
1 5 10 15

Xaa

<210> 42
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> VEPEP-9e

 10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo

 15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (2)..(2)
 <223> X = beta-A o S

 20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (17)..(17)
 <223> X = cisteamida

 25 <400> 42
 Xaa Xaa Trp Trp Gly Ser Trp Ala Thr Pro Arg Arg Arg Trp Trp Arg
 1 5 10 15

 Xaa

 <210> 43
 <211> 17
 30 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> VEPEP-9f

 35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo

 40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (2)..(2)
 <223> X = beta-A o S

 45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (17)..(17)
 <223> X = cisteamida

 50 <400> 43
 Xaa Xaa Trp Trp Arg Trp Trp Ala Pro Trp Ala Arg Ser Trp Trp Arg
 1 5 10 15

 Xaa

 <210> 44
 55 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>

<223> ST-VEPEP-6a

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 5 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 10 <222> (2)..(2)
 <223> X = beta-A o S

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 15 <222> (9) .. (9)
 <223> X = R, que está unido al residuo S en la posición 13 por un enlace hidrocarbonado

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 20 <222> (13)..(13)
 <223> X = S, que está unido al residuo R en la posición 9 por un enlace hidrocarbonado

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 25 <222> (21) .. (21)
 <223> X = cisteamida

<400> 44
 Xaa Xaa Leu Phe Arg Ala Leu Trp Xaa Leu Leu Arg Xaa Leu Trp Arg
 1 5 10 15

Leu Leu Trp Lys Xaa
 20

30 <210> 45
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> ST-VEPEP-6aa

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 40 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 45 <222> (2)..(2)
 <223> X = beta-A o S

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 50 <222> (9) .. (9)
 <223> X = R, que está unido al residuo S en la posición 13 por un enlace hidrocarbonado

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 55 <222> (13)..(13)
 <223> X = S, que está unido al residuo S en la posición 9 por un enlace hidrocarbonado

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 60 <222> (21) .. (21)

<223> X = cisteamida

<400> 45

Xaa Xaa Leu Phe Leu Ala Arg Trp Xaa Leu Leu Arg Xaa Leu Trp Arg
1 5 10 15

Leu Leu Trp Lys Xaa
20

5

<210> 46

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> ST-VEPEP-6ab

<220>

15 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA

<222> (1)..(1)

<223> X = un acetilo

<220>

20 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA

<222> (2)..(2)

<223> X = beta-A o S

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA

<222> (9) .. (9)

<223> X = S, que está unido al residuo S en la posición 13 por un residuo hidrocarbonado

<220>

30 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA

<222> (13)..(13)

<223> X = S, que está unido al residuo S en la posición 9 por un enlace hidrocarbonado

<220>

35 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA

<222> (21) .. (21)

<223> X = cisteamida

<400> 46

Xaa Xaa Leu Phe Arg Ala Leu Trp Xaa Leu Leu Arg Xaa Leu Trp Arg
1 5 10 15

Leu Leu Trp Lys Xaa
20

40

<210> 47

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

45

<220>

<223> ST-VEPEP-6ad

<220>

50 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA

<222> (1)..(1)

<223> X = un acetilo

<220>

55 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA

<222> (2)..(2)

<223> X = beta-A o S

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA

5 <222> (9) .. (9)
 <223> X = S, que está unido al residuo S en la posición 13 por un enlace hidrocarbonado

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA

10 <222> (13)..(13)
 <223> X = S, que está unido al residuo S en la posición 9 por un enlace hidrocarbonado

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA

15 <222> (21) .. (21)
 <223> X = cisteamida

<400> 47
 Xaa Xaa Leu Phe Leu Ala Arg Trp Xaa Leu Leu Arg Xaa Leu Trp Arg
 1 5 10 15

Leu Leu Trp Lys Xaa
 20

20 <210> 48
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> ST-VEPEP-6b

<220>
 30 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo

<220>
 35 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (2)..(2)
 <223> X = beta-A o S

<220>
 40 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (12)..(12)
 <223> X = R, que está unido al residuo S en la posición 16 por un enlace hidrocarbonado

<220>
 45 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (16)..(16)
 <223> X = S, que está unido al residuo R en la posición 12 por un enlace hidrocarbonado

<220>
 50 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (21) .. (21)
 <223> X = cisteamida

<400> 48
 Xaa Xaa Leu Phe Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Xaa Ser Leu Trp Xaa
 1 5 10 15

Leu Leu Trp Lys Xaa
 20

55 <210> 49

<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
 <223> ST-VEPEP-6ba

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> X = un acetilo

15 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> X = beta-A o S

20 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (12)..(12)
<223> X = R, que está unido al residuo S en la posición 16 por un enlace hidrocarbonado

25 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (16)..(16)
<223> X = S, que está unido al residuo R en la posición 12 por un enlace hidrocarbonado

30 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (21) .. (21)
<223> X = cisteamida

<400> 49
Xaa Xaa Leu Phe Leu Ala Arg Trp Arg Leu Leu Xaa Ser Leu Trp Xaa
1 5 10 15

Leu Leu Trp Lys Xaa
20

35

- <210> 50
- <211> 21
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>
<223> ST-VEPEP-6bb

45 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> X = un acetilo

50 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> X = beta-A o S

55 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (12)..(12)
<223> X = S, que está unido al residuo S en la posición 16 por un enlace hidrocarbonado

60 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (16)..(16)

<223> X = S, which is linked to the S residue at position 12 by a hydrocarbon linkage

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 5 <222> (21) .. (21)
 <223> X = cisteamida

<400> 50
 Xaa Xaa Leu Phe Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Xaa Ser Leu Trp Xaa
 1 5 10 15
 10 Leu Leu Trp Lys Xaa
 20

<210> 51
 <211> 21
 15 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> ST-VEPEP-6bd
 20

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo
 25

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (2)..(2)
 <223> X = beta-A o S
 30

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (12)..(12)
 <223> X = S, que está unido al residuo S en la posición 16 por un enlace hidrocarbonado
 35

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (16)..(16)
 <223> X = S, que está unido al residuo S en la posición 12 por un enlace hidrocarbonado
 40

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (21) .. (21)
 <223> X = cisteamida
 45

<400> 51
 Xaa Xaa Leu Phe Leu Ala Arg Trp Arg Leu Leu Xaa Ser Leu Trp Xaa
 1 5 10 15
 Leu Leu Trp Lys Xaa
 20

<210> 52
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50

<220>
 <223> ST-VEPEP-6c
 55

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (1)..(1)
 60 <223> X = un acetilo

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (2).. (2)
 5 <223> X = beta-A o S

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (6)..(6)
 10 <223> X = R, que está unido al residuo S en la posición 13 mediante un enlace hidrocarbonado

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (13)..(13)
 15 <223> X = S, que está unido al residuo R en la posición 6 por un enlace hidrocarbonado

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNA
 <222> (21) .. (21)
 20 <223> X = cisteamida

<400> 52
 Xaa Xaa Leu Phe Ala Xaa Leu Trp Arg Leu Leu Arg Xaa Leu Trp Arg
 1 5 10 15

Leu Leu Trp Lys Xaa
 20

25

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de penetración celular que se caracteriza porque comprende una secuencia de aminoácidos: $X_3X_4X_1X_2X_5X_4X_1X_2X_6X_7X_1X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}$ (SEQ ID No: 11), en donde X_1 es F o W, X_2 es F, W o Y, X_3 es beta-A o S, X_4 es K, R o L, X_5 es E, R o S, X_6 es R, T o S, X_7 es E, R o S, X_8 no es ni F ni W, X_9 es P o R, X_{10} es R o L, X_{11} es K, W o R, X_{12} es R o F y X_{13} es R o K.
2. El péptido de penetración celular de la reivindicación 1, que se caracteriza porque comprende una secuencia de aminoácidos $X_3X_4WX_2EX_4WX_2X_6X_7X_1PRX_{11}RX_{13}$ (SEQ ID No: 12), en donde X_1 es F o W, X_2 es F, W o Y, X_3 es beta-A o S, X_4 es K o R, X_6 es T o R, X_7 es E o R, X_{11} es R o K, y X_{13} es R o K.
3. El péptido de penetración celular de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde la secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en:
- $X_3KWFERWFREWPRKRR$ (SEQ ID No: 1)
 - $X_3KWWERWWREWPRKRK$ (SEQ ID No: 2)
 - $X_3RWWEKWWTRWPRKRK$ (SEQ ID No: 3), y
 - $X_3RWYKWKYTEFPRRRR$ (SEQ ID No: 4),
- en donde X_3 es beta-A o S.
4. Un péptido de penetración celular derivado de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 por adición de un aminoácido no natural entre los aminoácidos de las posiciones 2 y 3 de la SEQ ID No: 11 o la SEQ ID No: 12, por reemplazamiento del aminoácido de la posición 10 (correspondiente a X_7) de la SEQ ID No: 11 o la SEQ ID No: 12 por un aminoácido no natural, y por adición de un enlace hidrocarbonado entre los dos aminoácidos no naturales.
5. El péptido de penetración celular de la reivindicación 4, que se caracteriza porque comprende la secuencia de aminoácidos $X_3KX_{14}WWERWWRX_7WPRKRK$ (SEQ ID No: 9), en donde X_3 es una beta-alanina o una serina, X_{14} es un aminoácido no natural, X_7 está reemplazado por un aminoácido no natural, y existe un enlace hidrocarbonado entre los dos aminoácidos no naturales.
6. El péptido de penetración celular de la reivindicación 1, que se caracteriza porque comprende una secuencia de aminoácidos: $X_3X_4X_1WX_5X_4X_1WX_6X_7WX_8X_9X_{10}WX_{12}R$ (SEQ ID No: 13), en donde X_1 es F o W, X_3 es beta-A o S, X_4 es K, R o L, X_5 es R o S, X_6 es R o S, X_7 es R o S, X_8 es F o W, X_9 es R o P, X_{10} es L o R, y X_{12} es R o F.
7. El péptido de penetración celular de la reivindicación 1 o de la reivindicación 6, en donde la secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en:
- $X_3RWWRLWWRSWFRLWRR$ (SEQ ID No: 5)
 - $X_3LWWRRWWSRWWPRWRR$ (SEQ ID No: 6)
 - $X_3LWWSRWWRSWFRLWFR$ (SEQ ID No: 7), y
 - $X_3KFWSRFWRSWFRLWRR$ (SEQ ID No: 8),
- en donde X_3 es beta-A o S.
8. Un péptido de penetración celular derivado de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1, 6 y 7 por reemplazamiento de los aminoácidos de la posición 5 (correspondiente a X_5) y 12 (correspondiente a X_8) de la SEQ ID No: 13 por aminoácidos no naturales, y por adición de un enlace hidrocarbonado entre los dos aminoácidos no naturales.
9. El péptido de penetración celular de la reivindicación 8, que se caracteriza porque comprende la secuencia de aminoácidos $X_3RWWX_5LWWRWX_8RLWRR$ (SEQ ID No: 10), en donde X_3 es una beta alanina o una serina, y en donde X_5 y X_8 están reemplazados por aminoácidos no naturales usados para la unión de un enlace hidrocarbonado.
10. El péptido de penetración celular de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que además comprende:
- ligado covalentemente al extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos, una o varias entidades químicas seleccionadas del grupo que consiste en un acetilo, un ácido graso, un colesterol, un poli-etilen glicol, una señal de localización nuclear, una señal de exportación nuclear, un anticuerpo, un polisacárido y una molécula dirigida a diana; o
 - ligado covalentemente al extremo C-terminal de dicha secuencia de aminoácidos, uno o varios grupos seleccionados del grupo que consiste en una cisteamida, una cisteína, un tiol, una amida, un ácido nitriloacético sustituido opcionalmente, un carboxilo, un alquilo C1-C6 lineal o ramificado sustituido opcionalmente, una amina primaria o secundaria, un derivado osídico, un lípido, un fosfolípido, un ácido graso, un colesterol, un poli-etilen glicol, una señal de exportación nuclear de localización nuclear, un anticuerpo, un polisacárido y una molécula dirigida a diana; o

- ligado covalentemente al extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos, una o varias entidades químicas seleccionadas del grupo que consiste en un acetilo, un ácido graso, un colesterol, un poli-etilen glicol, una señal de localización nuclear, una señal de exportación nuclear, un anticuerpo, un polisacárido y una molécula dirigida a diana, y ligado covalentemente al extremo C-terminal de dicha secuencia de aminoácidos, uno o varios grupos seleccionados del grupo que consiste en una cisteamida, una cisteína, un tiol, una amida, un ácido nitriloacético sustituido opcionalmente, un carboxilo, un alquilo C1-C6 lineal o ramificado sustituido opcionalmente, una amina primaria o secundaria, un derivado osídico, un lípido, un fosfolípido, un ácido graso, un colesterol, un poli-etilen glicol, una señal de exportación nuclear de localización nuclear, un anticuerpo, un polisacárido y una molécula dirigida a diana.
- 5
- 10 **11.** Un complejo que comprende un péptido de penetración celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y una carga seleccionada entre péptidos, proteínas, análogos peptídicos, oligonucleótidos no cargados eléctricamente, PNAs y moléculas hidrofóbicas pequeñas que incluyen aminoácidos, di- o tri-péptidos, daunomicina, Paclitaxel, doxorubicina, AZT, porfirina, nucleósidos o nucleótidos marcados fluorescentemente, maghemita hidrofóbica y colorantes fluorescentes.
- 15 **12.** Una nanopartícula que comprende un núcleo que comprende una carga que forma un complejo con una primera entidad seleccionada del grupo que consiste en péptidos de penetración celular, liposomas, estructuras policationicas y nanopartículas de carbono, en donde dicho núcleo está recubierto por un péptido de penetración celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 20 **13.** La nanopartícula de la reivindicación 12, en donde dicha primera entidad es un péptido de penetración celular seleccionado del grupo que consiste en VEPEP-6a (SEQ ID No: 29), VEPEP-6b (SEQ ID No: 30), VEPEP-6c (SEQ ID No: 31), VEPEP-6d (SEQ ID No: 32), VEPEP-6e (SEQ ID No: 33), VEPEP-6f (SEQ ID No: 34), VEPEP-9a1 (SEQ ID No: 35), VEPEP-9a2 (SEQ ID No: 36), VEPEP-9b1 (SEQ ID No: 37), VEPEP-9b2 (SEQ ID No: 38), VEPEP-9c1 (SEQ ID No: 39), VEPEP-9c2 (SEQ ID No: 40), CADY, MPG, PEP-1, PPTG1, estructura de poli Arginina y péptidos de penetración celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 25 **14.** El complejo de la reivindicación 11, o de la nanopartícula de la reivindicación 12 o 13, en donde el tamaño del complejo o de la nanopartícula está entre 20 y 300 nm.
- 15.** El complejo o nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde el péptido de penetración celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 comprende un grupo poli-etilen glicol ligado covalentemente a su extremo N, y/o un grupo cisteamida ligado covalentemente a su extremo C.
- 30 **16.** El complejo o nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en donde al menos parte de los péptidos de penetración celular están ligados a una molécula dirigida a diana.
- 17.** El complejo o nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, para uso como medicamento.
- 18.** El complejo o nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, para uso como marcador o como agente de obtención de imágenes.
- 35 **19.** El complejo o nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, para uso en el tratamiento de una enfermedad cerebral o una enfermedad de nodos linfáticos.
- 20.** Una composición terapéutica, cosmética o diagnóstica que comprende un complejo o una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16.
- 40 **21.** Un método para administrar una molécula a una célula in vitro, que comprende una etapa de poner dicha célula en contacto con un complejo o nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, que comprende dicha molécula.

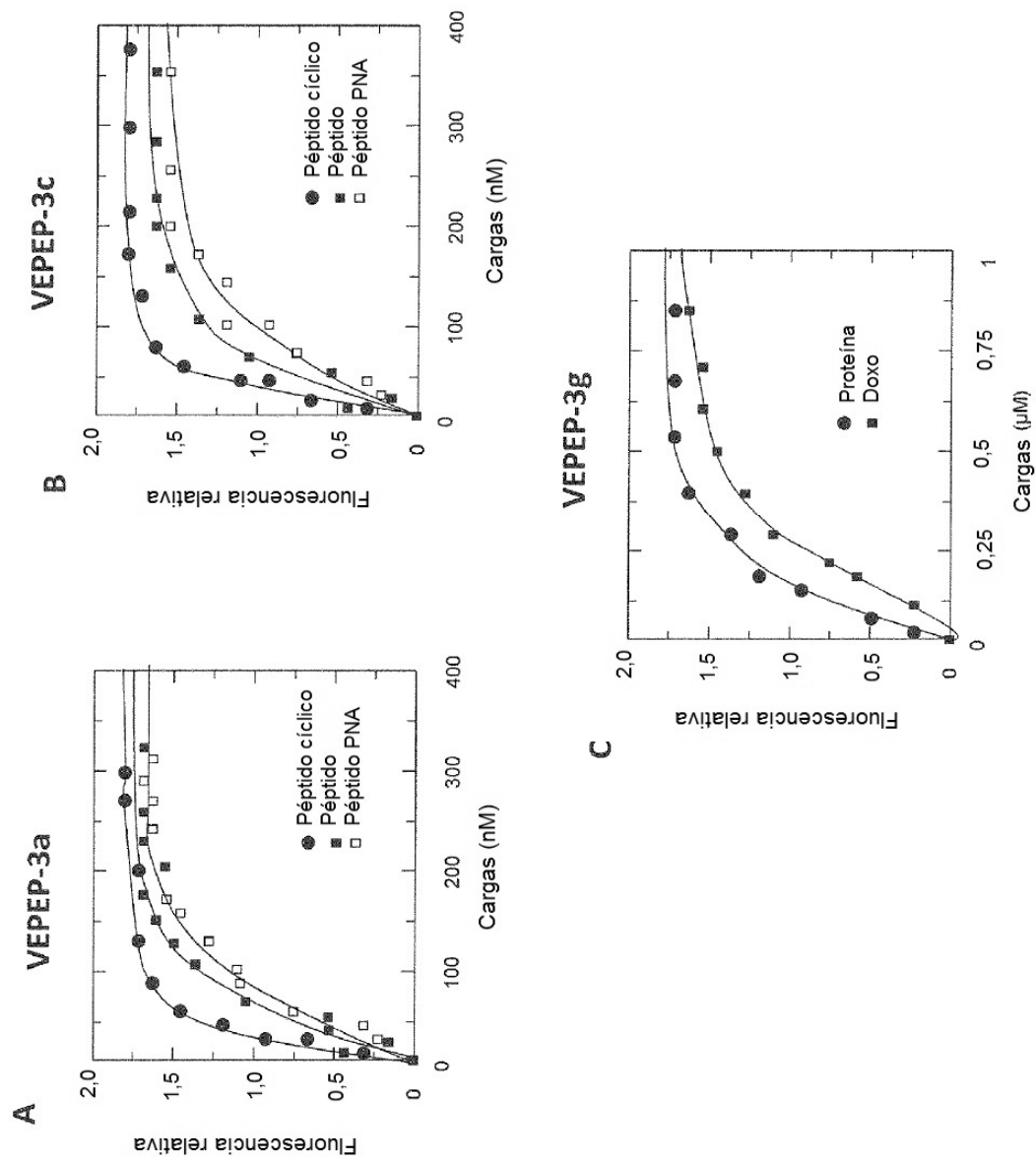


Figura 1

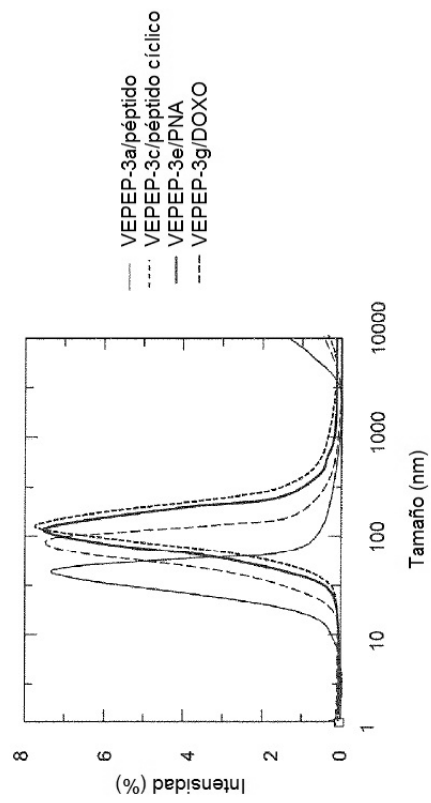


Figura 2

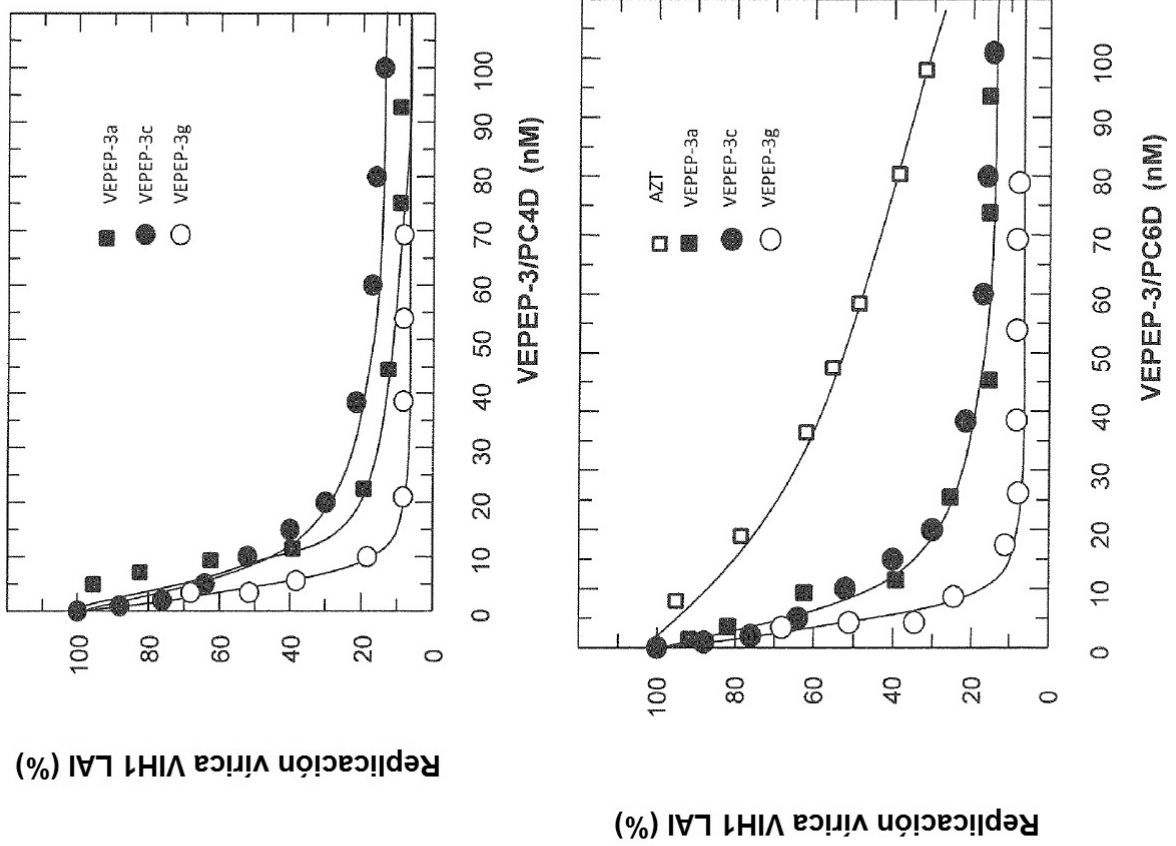


Figura 3

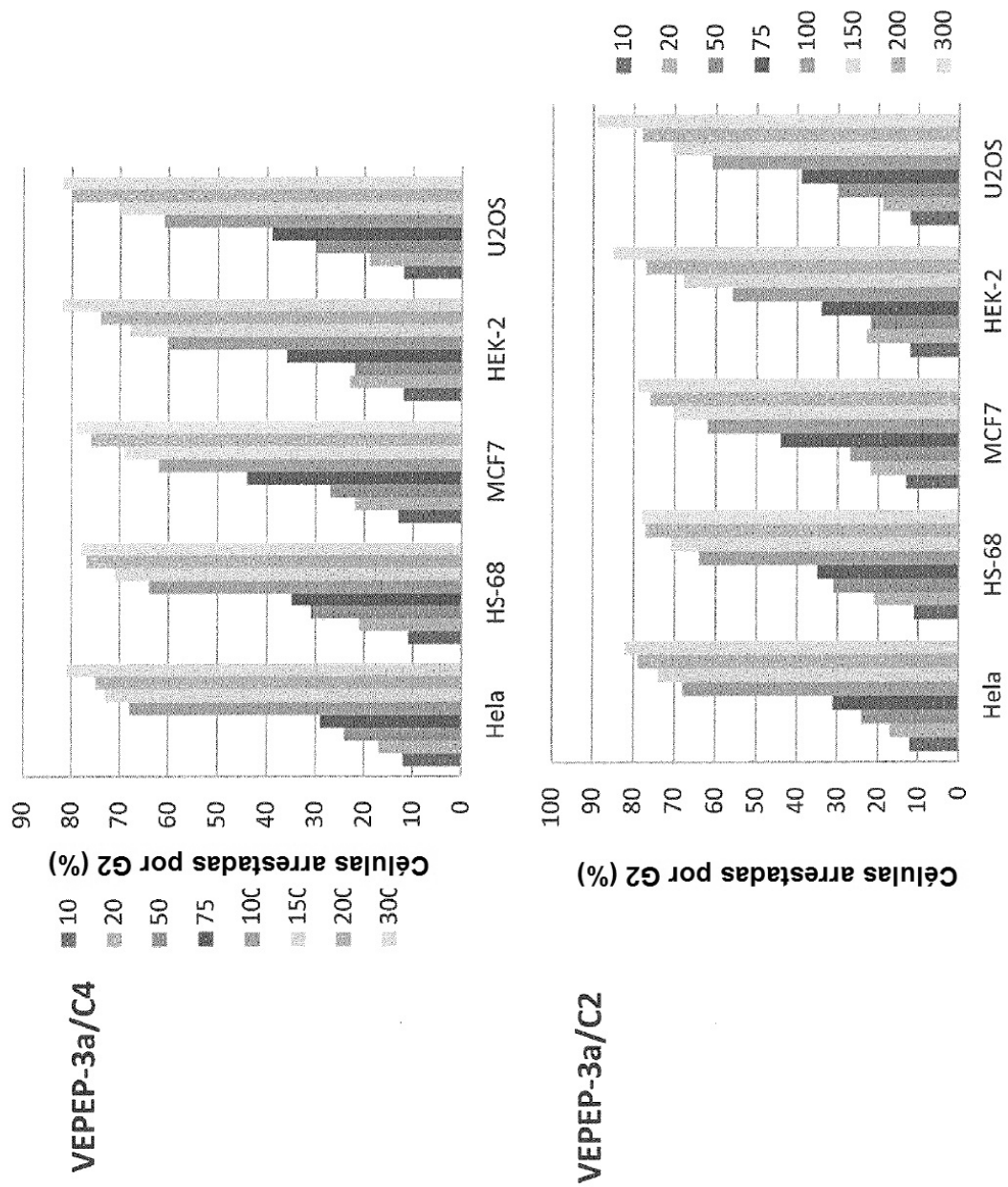


Figura 4

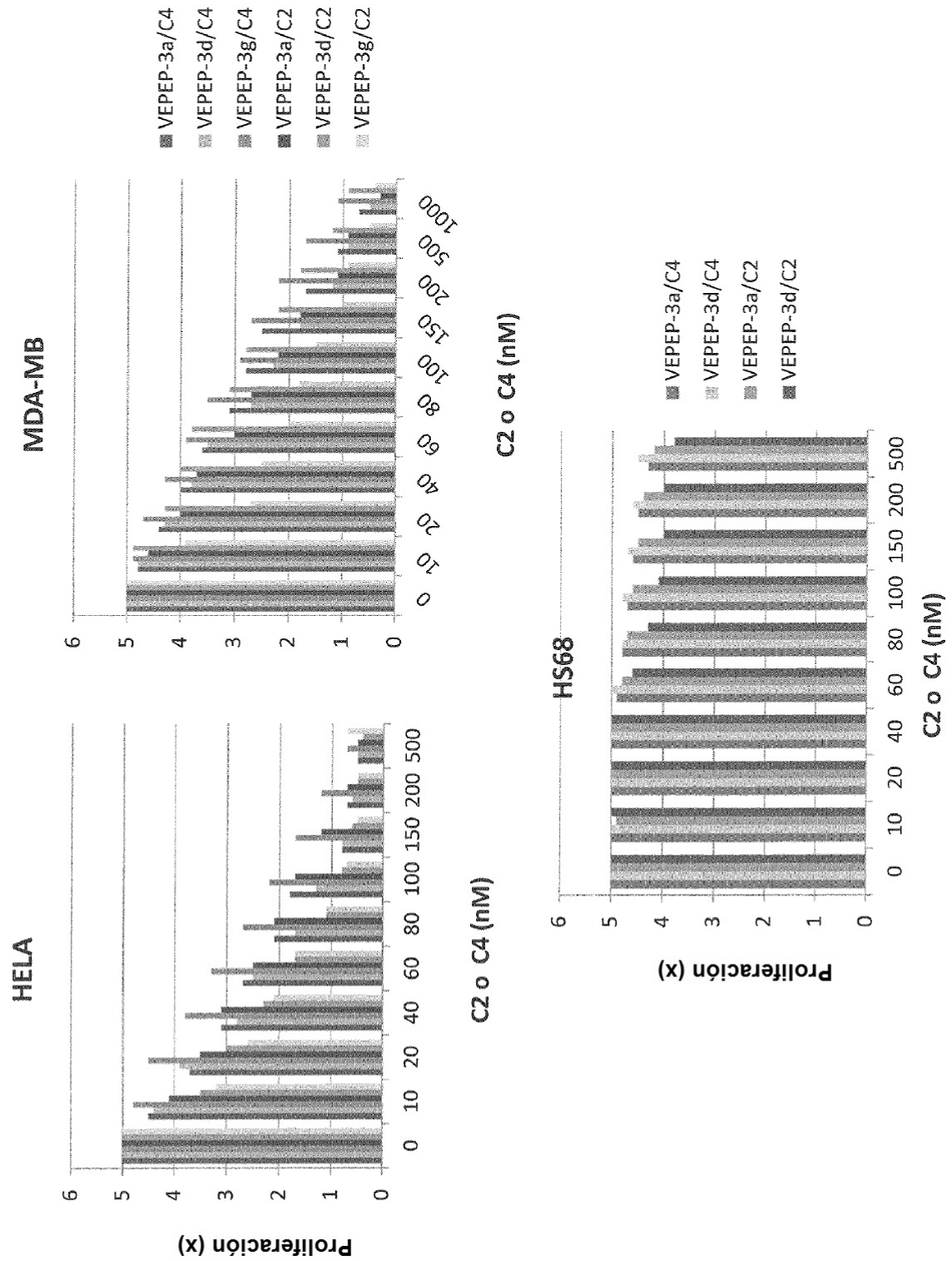


Figura 5

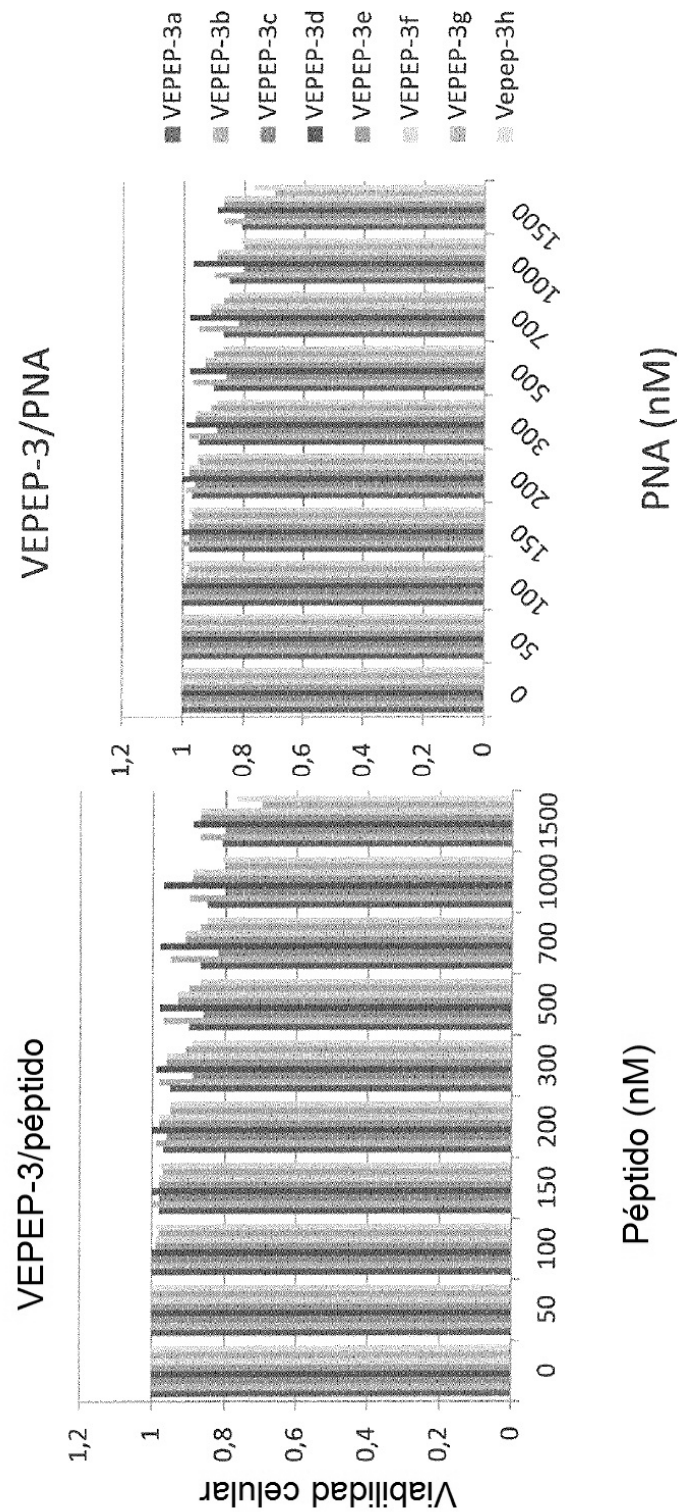


Figura 6

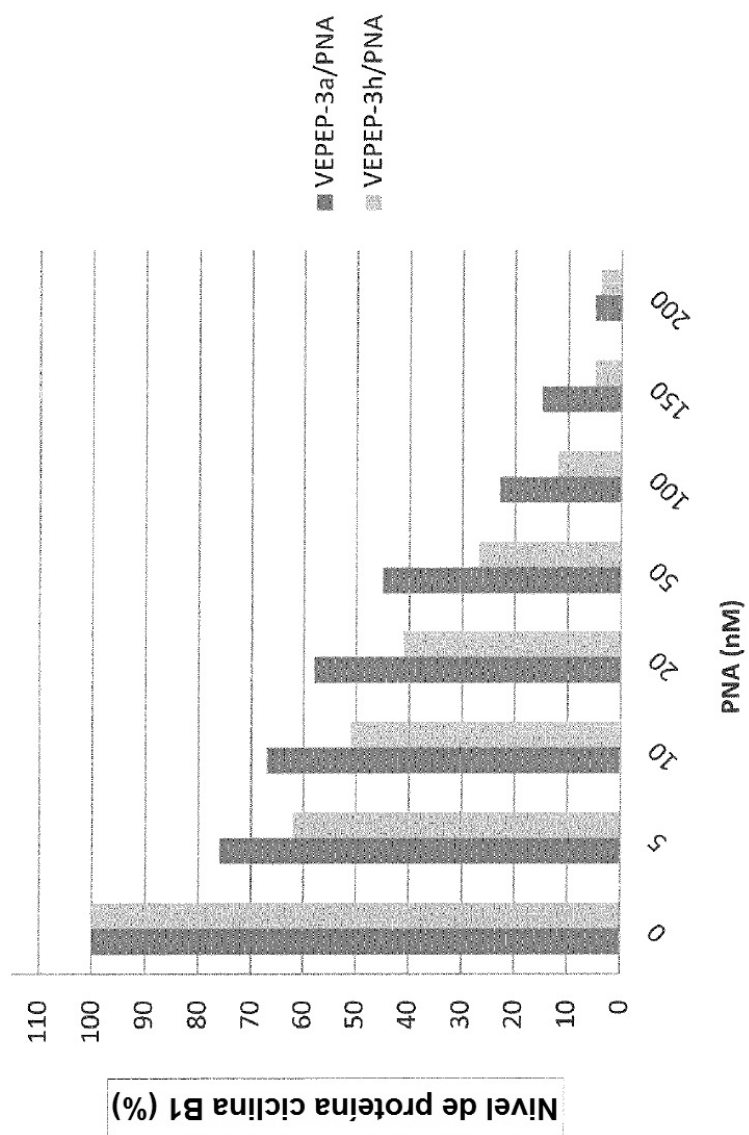


FIGURA 7

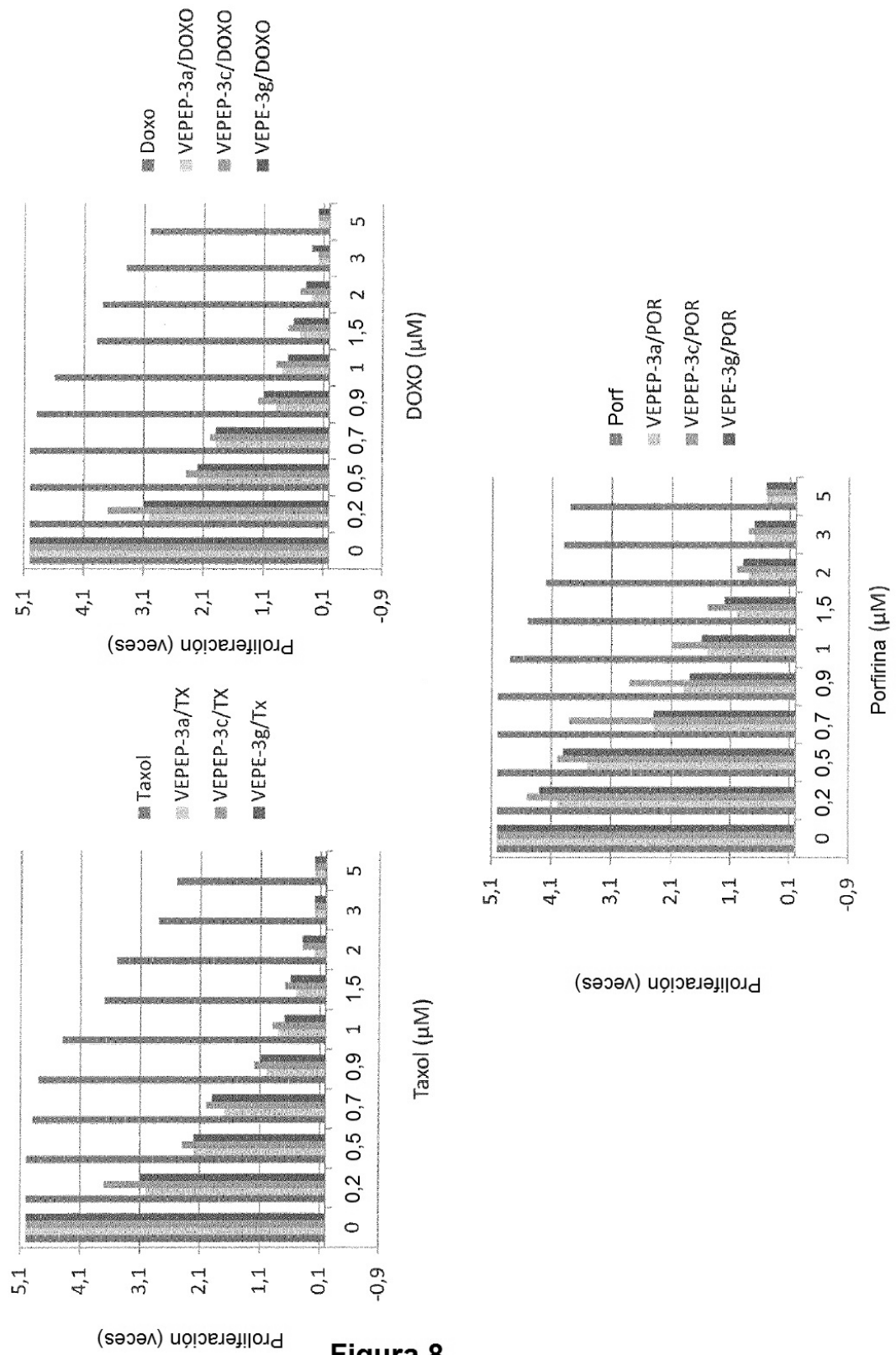


Figura 8

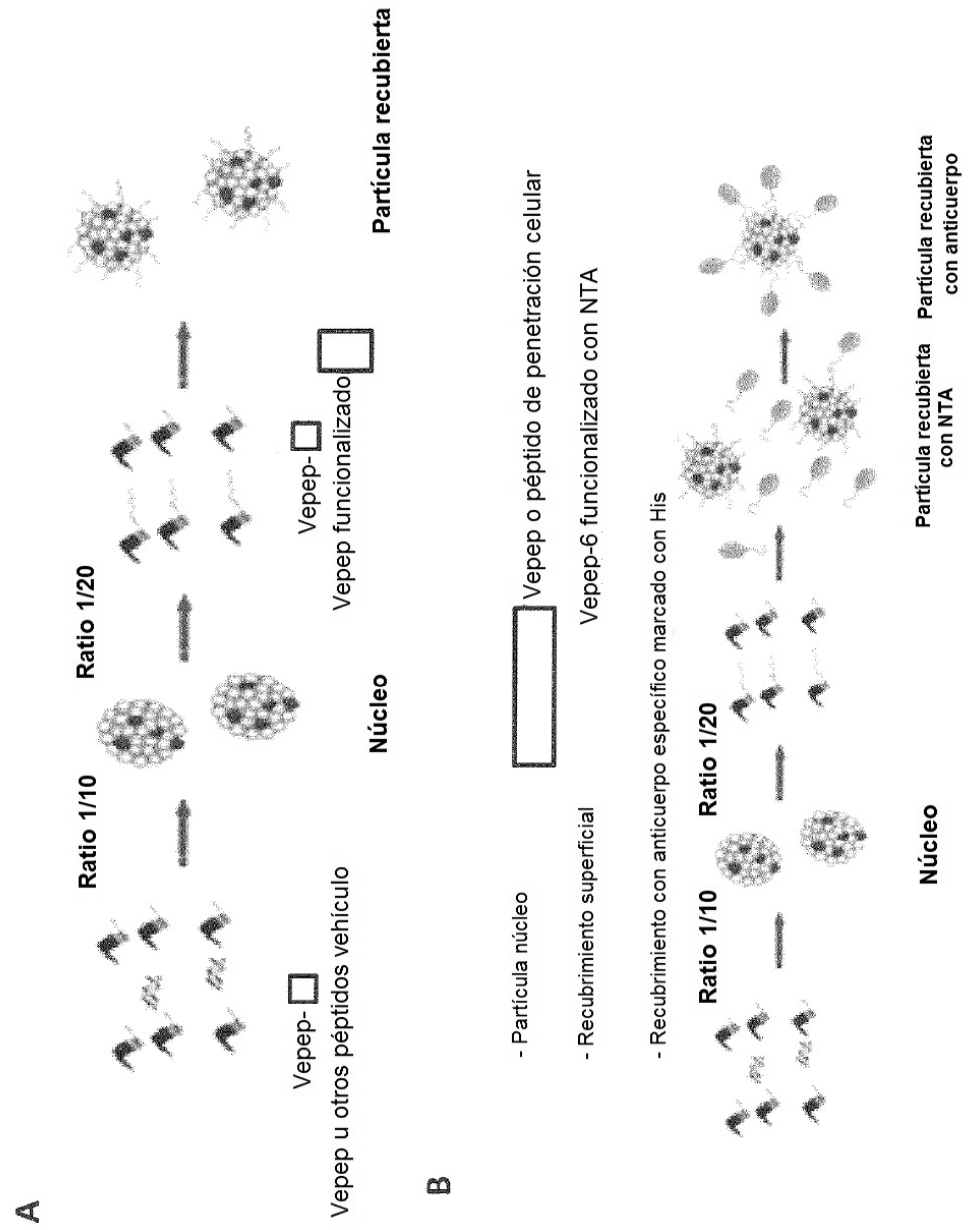


Figura 9

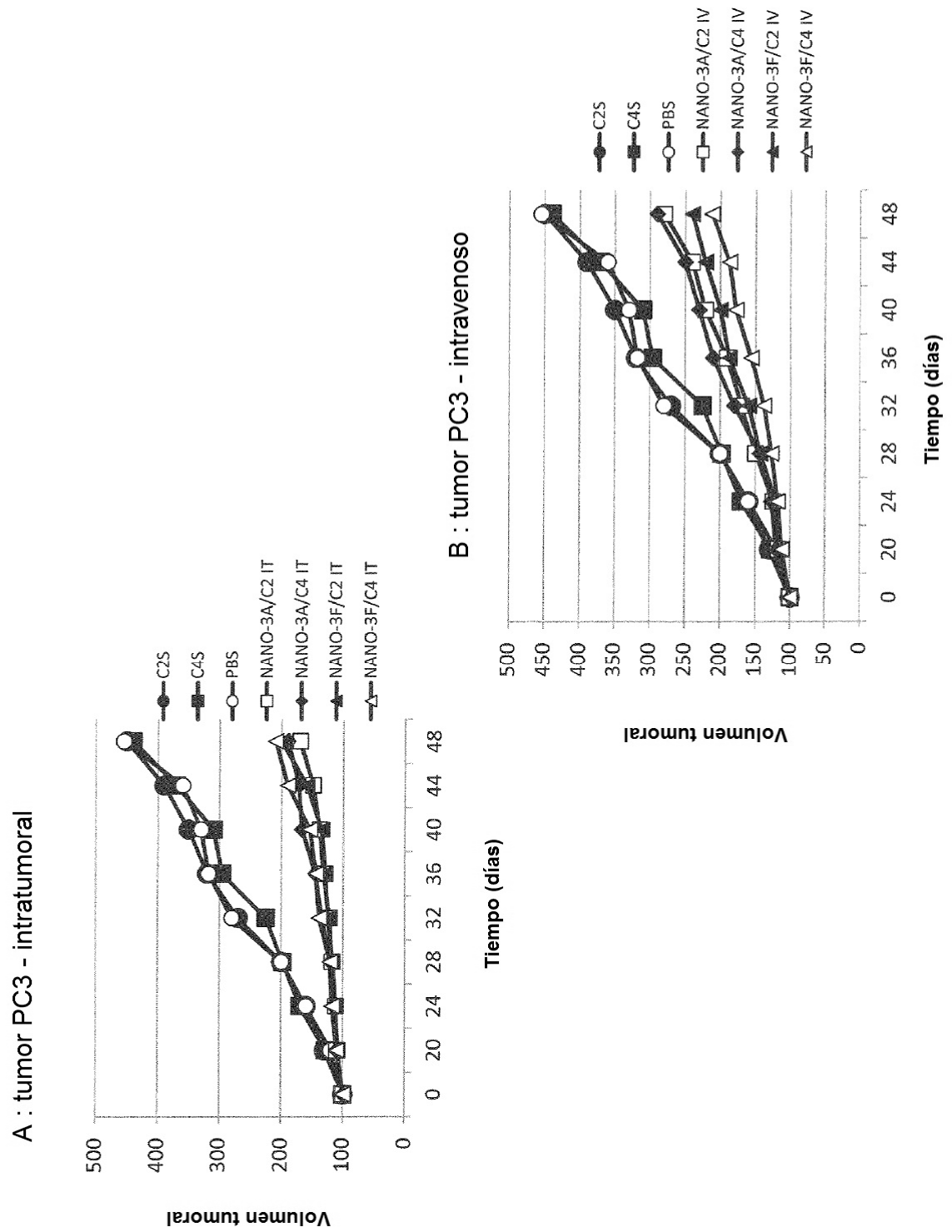


Figura 10

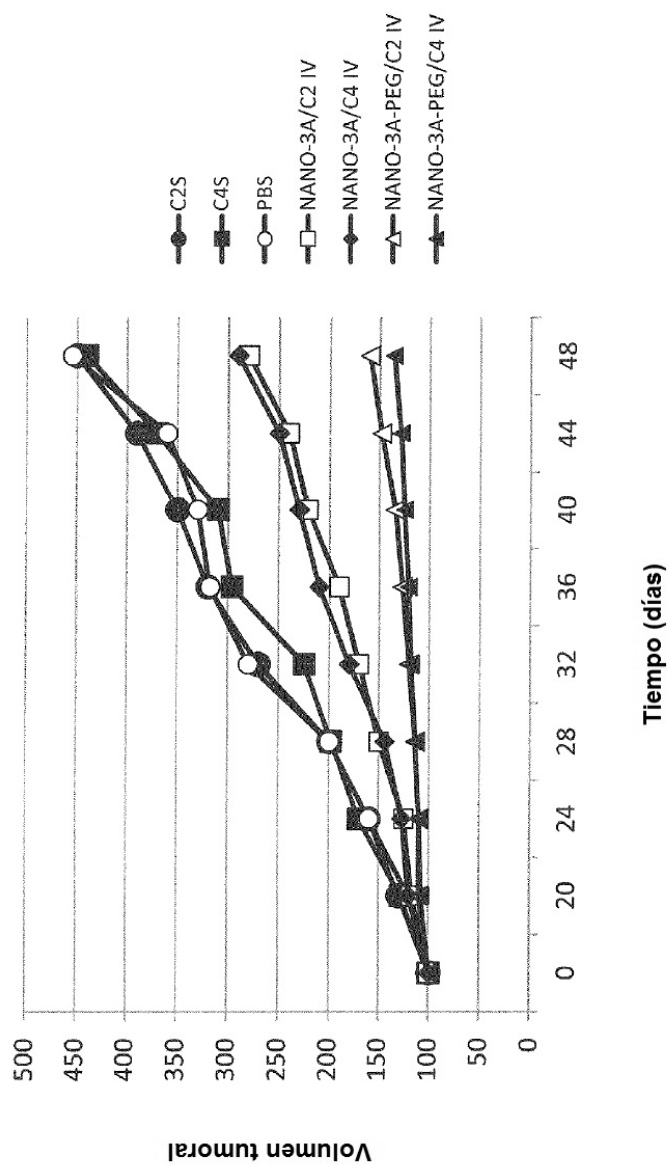


Figura 11

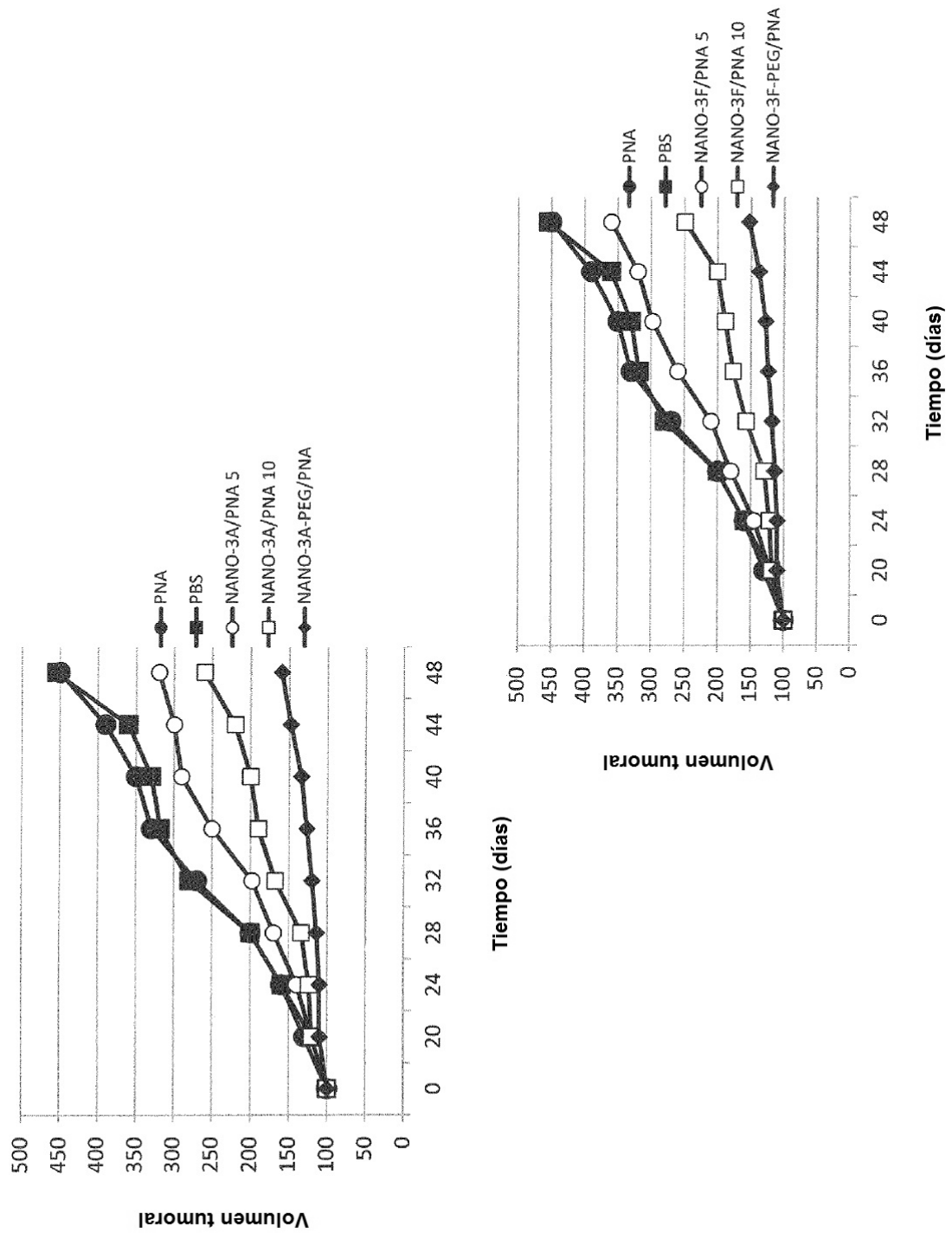


Figura 12

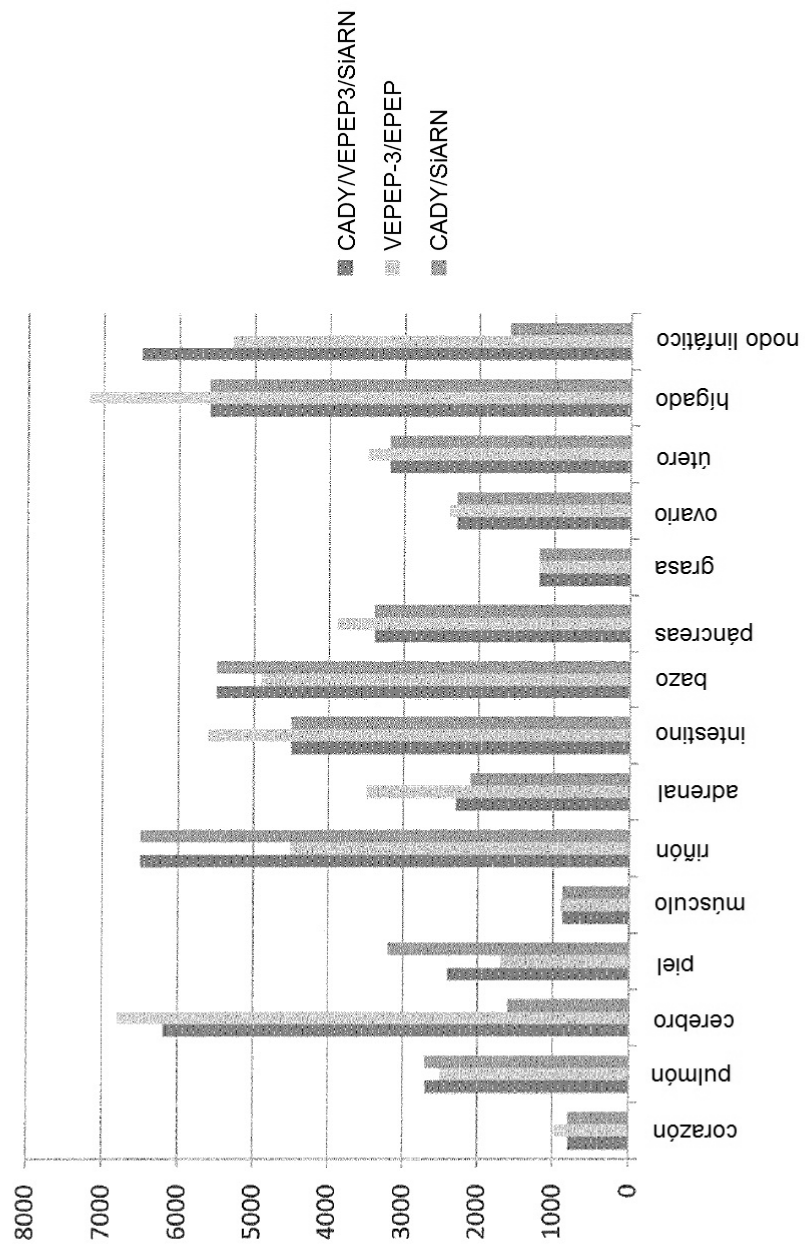


Figura 13

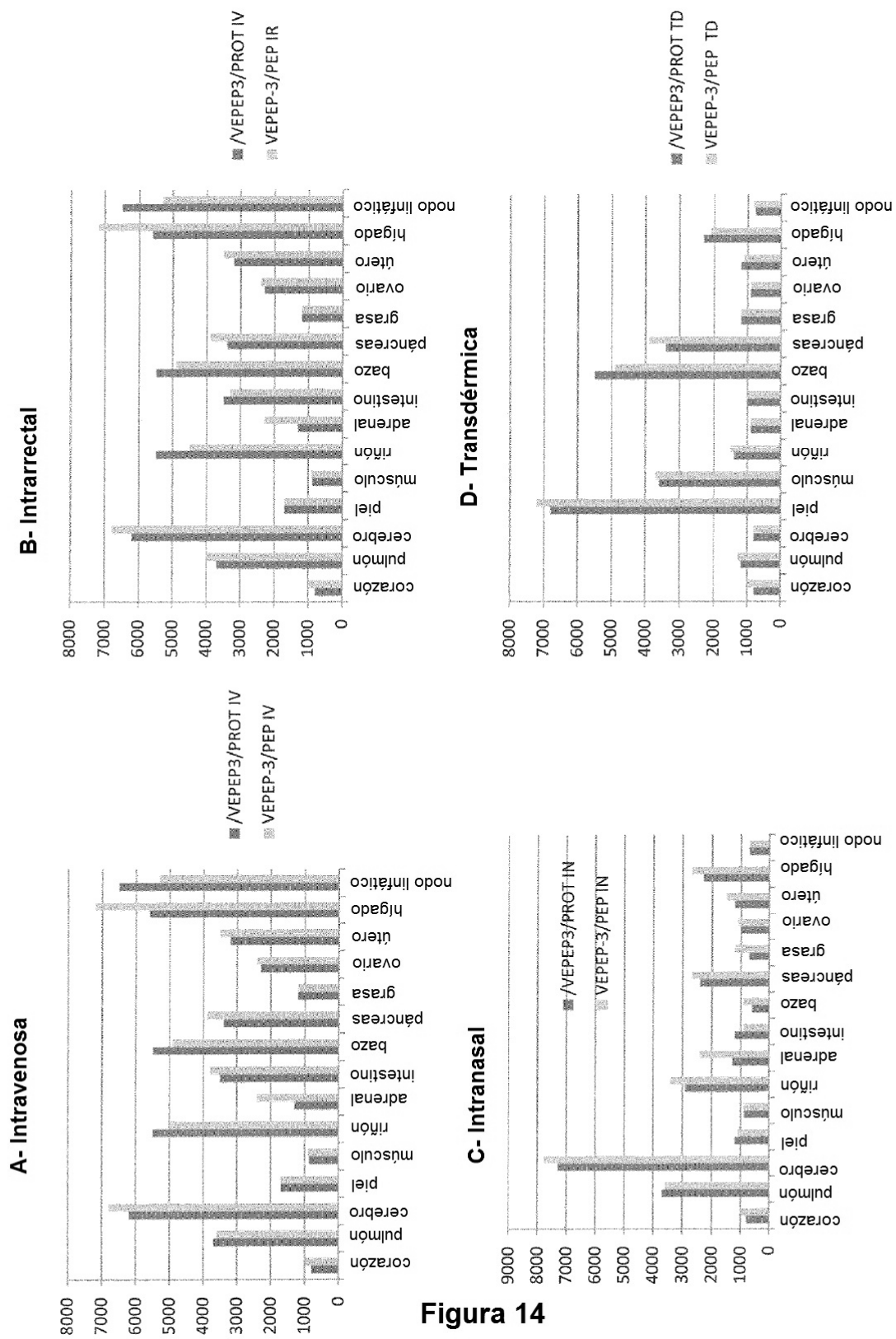


Figura 14