

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 987**

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/EP2013/070680**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO14053624**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2013 E 13779159 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018 EP 2928908**

54 Título: **Péptidos que penetran en las células para la administración intracelular de moléculas**

30 Prioridad:

04.10.2012 WO PCT/IB2012/055344

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.10.2018

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, S.L.P

ES 2 687 987 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 que penetran en las células para la administración intracelular de moléculas

Campo de la invención

5 La presente invención pertenece al campo de la administración intracelular de moléculas tales como ácidos nucleicos y pequeñas moléculas hidrófobas. En particular, la invención se refiere a una nueva familia de péptidos que penetran en las células (CPP, del inglés "Cell-Penetrating Peptide"), que muestra una alta eficacia, baja toxicidad y es particularmente eficaz para aplicaciones transdérmicas.

Antecedentes de la invención

10 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, falta de especificidad, 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 hacia su diana pero que no siguen las reglas de Lipinski. La potencia farmacéutica de esas moléculas sigue estando restringida por su baja estabilidad *in vivo* y por su baja captación en las células. Por lo tanto, la "administración" se ha convertido en el tema central del puzzle terapéutico, y se han establecido nuevas metas 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 endosómica 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, lipídicas y formulaciones basadas en péptidos, pero solo algunas de esas tecnologías han sido efectivas *in vivo* y han alcanzado la práctica clínica. Los Péptidos que Penetran en las Células (CPP) son una de las estrategias no víricas más prometedoras. Aunque la definición de los CPPs está evolucionando continuamente, generalmente se describen como péptidos cortos de menos de 30 aminoácidos, obtenidos a partir de proteínas o de secuencias químéricas. Habitualmente son anfipáticos y poseen una carga neta positiva [3-5]. Los CPPs son capaces de penetrar a través de membranas biológicas, para provocar el movimiento de diversas biomoléculas a través de las membranas celulares hacia el citoplasma, y para mejorar su encaminamiento intracelular, facilitando de este modo las interacciones con la diana. Los CPPs se pueden subdividir 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 los CPPs de ambas estrategias favorecen la administración de un gran panel de cargas (ADN de plásmido, oligonucleótido, ARNs, PNA, proteína, péptido, liposoma, nanopartícula...) a una amplia variedad de tipos celulares y modelos *in vivo* [3-7].

35 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, se podían transportar al interior de las células y de una célula a otra [para una revisión, véanse las ref. 3,4]. La primera observación se realizó en 1988, por Frankel y Pabo. Ellos mostraron que la proteína transactivadora de la transcripción (Tat) del VIH-1 podía entrar en las células y translocarse al núcleo. En 1991, el grupo de Prochiantz había alcanzado las mismas conclusiones con el homeodominio de *Drosophila Antennapedia* y demostraron que ese 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 repetitivas (meros) obtenido a partir 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 que Penetra en las Células (CPP) fue introducida por el grupo de Langel, en 1998, con el diseño del primer vehículo peptídico químérico, el Transportán, que se había obtenido a partir del fragmento N-terminal del neuropéptido galanina, ligado a mastoparín, un péptido del veneno de avispa. Originalmente, se ha descrito que el transportán mejora la administración de PNAs en células cultivadas e *in vivo*. En 50 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 basaba en primer lugar en el vehículo peptídico corto (MPG) que consistía en dos dominios: un dominio hidrófilo (polar) y un dominio hidrófobo (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 obtenidos a partir de secuencias naturales o no naturales y la lista está aumentando constantemente. Se han obtenido péptidos a partir de la proteína VP22 del Virus del Herpes Simple, de calcitonina, de péptidos antimicrobianos o de toxinas, de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, así como de péptidos ricos en poliprolina [revisiones 4-6].

60

Descripción detallada

Los inventores han diseñado ahora una nueva familia de péptidos que penetran en las células para la administración de péptidos/proteínas, moléculas hidrófobas y cargadas, denominados VEPEP-9. Las estrategias para la administración usando péptidos VEPEP-9 como la capa exterior de nanopartículas se denominan NANOPEP-9.

- 5 VEPEP-9 son péptidos anfipáticos secundarios cortos que forman nanopartículas estables con moléculas tales como péptidos pequeños, análogos de péptidos, oligonucleótidos pequeños o derivados y moléculas pequeñas hidrófobas o cargadas, designadas a partir de este punto como "SHM". Los vectores VEPEP-9 comprenden la siguiente secuencia de aminoácidos: $X_1X_2X_3WWX_4X_5WAX_6X_3X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}WX_{13}R$ (SEQ ID No: 10), en donde:

- X_1 es beta-A o S;
- 10 X_2 es L o nada;
- X_3 es R o nada;
- X_4 es L, R o G;
- X_5 es R, W o S;
- X_6 es S, P o T;
- 15 X_7 es W o P;
- X_8 es F, A o R;
- X_9 es S, L, P o R;
- X_{10} es R o S;
- X_{11} es W o nada;
- 20 X_{12} es A, R o nada; y
- X_{13} es W o F; y

en donde si X_3 es nada, entonces X_2 , X_{11} y X_{12} tampoco son nada.

- De acuerdo con una realización particular de los péptidos que penetran en las células VEPEP-9 de acuerdo con la invención, el vector comprende una secuencia de aminoácidos de 19 o 20 aminoácidos, que consiste en:
- 25 $X_1X_2RWWLRWAX_6RWX_8X_9X_{10}WX_{12}WX_{13}R$ (SEQ ID No: 11), en donde:

- X_1 es beta-A o S;
- X_2 es L o nada;
- X_6 es S o P;
- X_8 es F o A;
- 30 X_9 es S, L o P;
- X_{10} es R o S;
- X_{12} es A o R; y
- X_{13} es W o F.

- De acuerdo con realizaciones preferidas de los vectores VEPEP-9 tal y como se han descrito en el párrafo anterior, que se ilustran en la parte experimental a continuación, la secuencia de aminoácidos del péptido que penetra en las células se selecciona a partir del grupo que consiste en:
- 35

- VEPEP9a1: $X_1LRWWLRWASRWFSRWAWWR$ (SEQ ID No: 1)
- VEPEP9a2: $X_1LRWWLRWASRWASRWAWFR$ (SEQ ID No: 2)
- VEPEP9b1: $X_1RWWLRWASRWALSWRWWR$ (SEQ ID No: 3),
- 40 – VEPEP9b2: $X_1RWWLRWASRWFLSWRWWR$ (SEQ ID No: 4),

- VEPEP9c1: X₁RWWLRWAPRWFP₅SWRWWR (SEQ ID No: 5), y
- VEPEP9c2: X₁RWWLRWASRWAP₅SWRWWR (SEQ ID No: 6),

en donde X₁ es beta-A o S.

5 De acuerdo con otra realización de los péptidos que penetran en las células VEPEP-9 de acuerdo con la invención, el vector comprende una secuencia de aminoácidos de 15 aminoácidos, que consiste en: X₁WWX₄X₅WAX₆X₇X₈RX₁₀WWR (SEQ ID No: 12), en donde:

X₁ es beta-A o S;

X₄ es R o G;

X₅ es W o S;

10 X₆ es S, T o P;

X₇ es W o P;

X₈ es A o R; y

X₁₀ es S o R.

15 De acuerdo con realizaciones preferidas de vectores VEPEP-9 tal y como se han descrito en el párrafo anterior, que se ilustran en la parte experimental a continuación, la secuencia de aminoácidos del péptido que penetra en las células se selecciona a partir del grupo que consiste en:

- VEPEP9d: X₁WWRWWASWARSWWR (SEQ ID No: 7),
- VEPEP9e: X₁WWGSWATPRRRWWR (SEQ ID No: 8) y
- VEPEP9f: X₁WWRWWAPWARSWWR (SEQ ID No: 9),

20 en donde X₁ es beta-A o S.

25 De acuerdo con una realización particular de la presente invención, el péptido que penetra en las células VEPEP-9 está grapado, lo que significa que comprende un enlace químico (además de la cadena de aminoácidos) entre dos residuos. En una realización particular de péptidos VEPEP-9 grapados, el péptido VEPEP-9 comprende un enlace hidrocarbonado entre dos residuos que están separados por tres o seis residuos. El experto en la materia puede obtener estos péptidos mediante el uso de métodos que están disponibles en la técnica, por ejemplo, tal y como se describe por Verdine y Hilinski, *Methods in Enzymology*, 2012 [12].

La estrategia de VEPEP-9 mejora tanto la administración *ex vivo* como *in vivo* y la eficacia del péptido y el análogo y moléculas hidrófobas pequeñas, sin activar la respuesta inmune innata o inducir efectos secundarios tóxicos.

30 De acuerdo con una realización preferida, un péptido que penetra en las células de la presente invención comprende además, ligadas covalentemente al extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos, una o varias entidades químicas seleccionadas a partir del grupo que consiste en un acetilo, un ácido graso, un colesterol, un polietilenglicol, una señal de localización nuclear, una señal de exportación nuclear, un anticuerpo, un polisacárido y una molécula dirigida a una diana (péptido, ácido graso, sacárido).

35 Tal y como se desarrolla más adelante y como se muestra al menos en el ejemplo 5 presentado a continuación, la PEGilación de péptidos VEPEP-9 es particularmente ventajosa para estabilizar nanopartículas *in vivo*.

40 Adicional o alternativamente, un péptido que penetra en las células de acuerdo con la invención puede comprender, ligados covalentemente al extremo C-terminal de su secuencia de aminoácidos, uno o varios grupos seleccionados a partir del grupo que consiste en una cisteamida, una cisteína, un tiol, una amida, un ácido nitrilotriacético opcionalmente sustituido, 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 polietilenglicol, una señal de localización nuclear, una señal de exportación nuclear, un anticuerpo, un polisacárido y una molécula dirigida a una diana.

45 Otro aspecto de la presente invención es un complejo que comprende un péptido que penetra en las células como el descrito anteriormente y una carga seleccionada entre ácidos nucleicos, proteínas, péptidos y moléculas hidrófobas. Los ejemplos de cargas de polipéptido son péptidos pequeños, péptidos cíclicos, biomarcadores basados en péptidos y biofármacos. Ejemplos de cargas de ácido nucleico son pequeños oligonucleótidos cargados o no cargados, tales como, por ejemplo, pequeños ARN o ADN de cadena sencilla (tamaño de entre 2 a 40 bases) y ARN o ADN de doble cadena (tamaño de hasta 100 pares de bases), en particular ARNs seleccionados para silenciar un ARNm

diana. Los péptidos que penetran en las células de acuerdo con la invención también se pueden usar para administrar una mezcla de varios ARNs diferentes, con una actividad inhibitora mejorada. Los microARNs (miARNs), seleccionados por su capacidad para afectar a la expresión de genes y proteínas que regulan la proliferación celular y/o la muerte celular, también pueden formar complejos con VEPEP-9. En otra realización preferida del complejo de acuerdo con la invención, la carga es una molécula pequeña (tamaño menor de 1,5 kDa), preferentemente hidrófoba, o bien hidrófoba o cargada. Las cargas preferidas en los complejos de acuerdo con la presente invención son fármacos anticancerígenos y antivirales. Ejemplos no limitativos de moléculas hidrófobas pequeñas que se pueden utilizar, incluyen un aminoácido, dipéptido o tripéptido (marcado o no), daunomicina, Paclitaxel, doxorubicina, AZT, porfirina, nucleósidos o nucleótidos marcados fluorescentemente (FAM-Guanosina, CY5-UTP, CY3-UTP), maghemita hidrófoba (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 de acuerdo con la invención, la relación molar de carga/VEPEP-9 depende de la naturaleza y del tamaño de la carga, pero generalmente está comprendida entre 1/1 y 1/50. Para cargas de péptidos o de oligonucleótidos pequeños, la relación molar de carga/VEPEP-9 varía preferiblemente de 1/5 a 1/20. Para cargas de moléculas pequeñas, la relación molar de carga/VEPEP-9 varía preferiblemente de 1/3 a 1/10.

De acuerdo con una realización ventajosa de los complejos tal y como se han descrito anteriormente, los péptidos VEPEP-9 comprenden un grupo de polietilenglicol o un grupo acetilo unido covalentemente a su extremo N-terminal, y/o un grupo cisteamida unido covalentemente a su extremo C-terminal.

Los complejos anteriores pueden usarse ventajosamente como “envolturas del núcleo” para obtener complejos más grandes, o nanopartículas, mediante una etapa adicional de recubrimiento del complejo carga/VEPEP-9 con otra capa de péptidos que penetran en las células, que pueden ser diferentes de los péptidos VEPEP-9 descritos anteriormente. Los ejemplos de tales nanopartículas son VEPEP-9/CADY (en donde CADY es un CPP como el descrito en el documento EP1795539 y en [11], VEPEP-9/PEP-1 (en donde Pep-1 es un CPP como el descrito en [8]), VEPEP-9/MPG (en donde MPG es un CPP como el descrito en el documento US7.514.530 y en [7,10]), así como nanopartículas recubiertas con un CPP que pertenece a otra familia de VEPEP, por ejemplo, seleccionado a partir de la siguiente lista:

- VEPEP-3a: Ac-X₁KWFERWFREWPRKRR-cisteamida (SEQ ID No: 25),
- VEPEP-3b: Ac-X₁KWWERWWREWPRKRK-cisteamida (SEQ ID No: 26),
- 30 – VEPEP-3c: Ac-X₁RWWEKWWTRWPRKRK-cisteamida (SEQ ID No: 27),
- VEPEP-3d: Ac-X₁RWYEKWYTEFPRRRR-cisteamida (SEQ ID No: 28),
- VEPEP-3e: Ac-X₁RWWRLWRSWFRLWRR-cisteamida (SEQ ID No: 29),
- VEPEP-3f: Ac-X₁LWRRWWSRWWPRWRR-cisteamida (SEQ ID No: 30),
- VEPEP-3g: Ac-X₁LWWSRWRSWFRLWFR-cisteamida (SEQ ID No: 31),
- 35 – VEPEP-3h: Ac-X₁KFWSRFWSWFRLWRR-cisteamida (SEQ ID No: 32),
- VEPEP-6a: Ac-X₁LFRALWLLRSLWLLWK-cisteamida (SEQ ID No: 33),
- VEPEP-6b: Ac-X₁LWRALWRLWRSWLLWKA-cisteamida (SEQ ID No: 34),
- VEPEP-6c: Ac-X₁LWRALWLLRSLWRLWRKA-cisteamida (SEQ ID No: 35),
- VEPEP-6d: Ac-X₁LWRALWRLWRSWRLWRKA-cisteamida (SEQ ID No: 36),
- 40 – VEPEP-6e: Ac-X₁WRALWLLRALWLLWKA-cisteamida (SEQ ID No: 37),
- VEPEP-6f: Ac-X₁LWRALWLLRNLWLLWKA-cisteamida (SEQ ID No: 38),
- VEPEP-3bstapl: Ac-X₁KR_sWVERWWR_sSWPRKRK-cisteamida (SEQ ID No: 39),
- VEPEP-3estapl: Ac-X₁RWWR_sLWRSWS_sRLWRR-cisteamida (SEQ ID No: 40),
- ST-VEPEP-6a: Ac-X₁LFRALWR_sLLRS_sLWLLWK-cisteamida (SEQ ID No: 41),
- 45 – ST-VEPEP-6aa: Ac-X₁LFLARWR_sLLRS_sLWLLWK-cisteamida (SEQ ID No: 42),

- ST-VEPEP-6ab: Ac-X₁LFRALWS_sLLRS_sLWRLWKCisteamida (SEQ ID No: 43),
- ST-VEPEP-6ad: Ac-X₁LFLARWS_sLLRS_sLWRLWKCisteamida (SEQ ID No: 44),
- ST-VEPEP-6b: Ac-X₁LFRALWRLLR_sSLWS_sLLWKCisteamida (SEQ ID No: 45),
- ST-VEPEP-6ba: Ac-X₁LFLARWRLLR_sSLWS_sLLWKCisteamida (SEQ ID No: 46),
- 5 – ST-VEPEP-6bb: Ac-X₁LFRALWRLLS_sSLWS_sLLWKCisteamida (SEQ ID No: 47),
- ST-VEPEP-6bd: Ac-X₁LFLARWRLLS_sSLWS_sLLWKCisteamida (SEQ ID No: 48),
- ST-VEPEP-6c: Ac-X₁LFAR_sLWRLLR_sLWRLWKCisteamida (SEQ ID No: 49),

así como variantes de los mismos (en relación con la secuencia de aminoácidos y/o los grupos químicos N-terminales y C-terminales), en donde X₁ es beta-A o S y en donde los residuos seguidos de una “s” en el subíndice están unidos mediante un enlace hidrocarbonado. Las variantes preferidas de las anteriores secuencias para formar nanopartículas de acuerdo con la invención, están PEGiladas en su extremo N-terminal en lugar de estar acetiladas.

Otro aspecto de la presente invención pertenece a nanopartículas preparadas a partir de una “envoltura del núcleo” que comprende una carga y una primera molécula vehículo, rodeada por péptidos VEPEP-9. En la presente memoria éstas se denominan partículas “NANOPEP-9”. La tecnología NANOPEP-9 constituye un sistema de administración “construido a medida” que contiene una partícula del núcleo común, que atrapa moléculas terapéuticas, con péptidos VEPEP-9 superficiales que preferiblemente están funcionalizados para ser dirigidos *in vivo* a un tumor o un tejido. Desde un punto de vista estructural, las partículas NANOPEP-9 están constituidas por un “núcleo” que está recubierto por una capa de péptidos VEPEP-9. El “núcleo” corresponde a un complejo que comprende una carga y un vector o vehículo tal como un primer péptido que penetra en las células, un liposoma, una estructura policatiónica, una nanopartícula de carbono, etc. En las partículas NANOPEP-9, la capa de péptidos VEPEP-9 (péptido periférico) estabiliza la partícula y puede estar funcionalizada. La funcionalización de la superficie de la partícula NANOPEP-9 con moléculas de colesterol, lípidos o PEG mejora la estabilidad de las partículas *in vivo*, favorece su administración a través de rutas sistémicas o tópicas y permite una liberación rápida de cargas activas dentro de células o tejidos tumorales. Se ha mostrado que la funcionalización de la superficie de las partículas NANOPEP-9 con fragmentos FAB pequeños, péptidos, anticuerpos y lípidos favorece el direccionamiento *in vivo* a dianas de tejido o tumores. Asimismo, la funcionalización de la superficie de la partícula NANOPEP-9 con un polisacárido tal como PLGA, se puede emplear como una formulación de liberación lenta de fármaco y carga, 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-9 que rodean a las partículas NANOPEP-9, aumenta la biodistribución de las cargas en el tumor (incremento de 10 a 20 veces), probablemente estabilizando las partículas NANOPEP-9 en el plasma.

La tecnología NANOPEP-9 mejora la administración celular e *in vivo* de cargas biológicamente activas, y ha sido validada en una amplia serie de líneas celulares que incluyen líneas celulares adherentes y en suspensión, líneas celulares difíciles de transfectar. Las partículas NANOPEP-9 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-9 presenta varias ventajas que incluyen una rápida administración con una eficacia muy elevada, estabilidad en tampones fisiológicos, protección de la carga contra la degradación, falta de toxicidad y de sensibilidad frente al suero, capacidad para formar nanopartículas mixtas, se pueden funcionalizar y se han aplicado con éxito para la administración de diferentes tipos de cargas en una amplia variedad de líneas celulares, así como en modelos animales, constituyendo de este modo unas herramientas potentes para la investigación básica y aplicaciones terapéuticas. La tecnología NANOPEP-9 se puede aplicar a niveles terapéuticos y diagnóstico/teragnósticos.

En una realización particular de las partículas NANOPEP-9 de acuerdo con la presente invención, la carga está formando un complejo con un primer péptido que penetra en las células, que se puede seleccionar, por ejemplo, entre CADY, MPG, PEP-1, PPTG1, poli Arginina, péptidos de la familia VEPEP (VEPEP-3, VEPEP-6, VEPEP-9, VEPEP-6 o VEPEP-3 grapados) como se ha descrito anteriormente (tal como las SEQ ID Nos: 1 a 10 y 25 a 49, y variantes de las mismas), o cualquier otro CPP conocido. Este complejo de carga/ CPP se recubre después con una capa de péptidos VEPEP-9. De acuerdo con 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 las partículas NANOPEP-9.

En las nanopartículas descritas anteriormente, la relación molar núcleo/VEPEP-9 depende de la naturaleza y del tamaño del núcleo, pero generalmente está comprendida entre 1/1 y 1/50. Para núcleos pequeños de péptidos/ CPP, la relación molar de núcleo/VEPEP-9 periférico preferiblemente oscila entre 1/5 y 1/30, dependiendo de la naturaleza de la carga de péptido (hidrofobicidad y carga).

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

De acuerdo con una realización ventajosa de las partículas NANOPEP-9 de acuerdo con la invención, al menos parte de los péptidos VEPEP-9 que forman la capa periférica de las nanopartículas comprenden un grupo polietilenglicol o acetilo unido covalentemente a su extremo N-terminal, y/o un grupo cisteamida unido covalentemente a su extremo C-terminal.

De acuerdo con otra realización preferida, la envoltura del núcleo de las partículas está recubierta con un péptido VEPEP-9 funcionalizado con NTA (por ejemplo, un péptido VEPEP-9 con ácido nitrilotriacético unido covalentemente a su extremo C-terminal). Esto permite la fijación posterior a la superficie de la partícula, de cualquier proteína (u otra molécula) que albergue un marcador de histidina. Esta estrategia ofrece la ventaja principal de presentar partículas con dos capas comunes "NANOPEPHIS-9" que se pueden asociar con cualquier molécula marcada con His.

En realizaciones particulares de los complejos y nanopartículas de acuerdo con la invención, al menos parte de los péptidos VEPEP-9 que penetran en las células están ligados a una molécula dirigida a una diana. En el caso de las partículas NANOPEP-9, ejemplos de moléculas dirigidas a una diana incluyen anticuerpos, nanocuerpos y fragmentos Fc o FAB dirigidos a HEK2, MUC1, EGF o XCCR4, así como a ligandos, especialmente dirigidos a receptores que están sobreexpresados en la superficie de determinados tipos celulares y que autoguián péptidos específicos de órganos seleccionados. Ejemplos no limitativos de tales ligandos y péptidos de autoguiado son: péptido-RGD, péptidos dirigidos a una diana para autoguiado (péptido NT1 cerebral, péptido GM1 ganglionar, así como todos los demás péptidos descritos previamente y seleccionados, dirigidos a una diana de tejidos y líneas celulares), ácido fólico, polisacáridos, motivo peptídico dirigido a metaloproteasas matriciales (MMP-9 o MMP3 para selectividad tumoral).

De acuerdo con una realización particular de la presente invención, los complejos o las nanopartículas se formulan de tal modo que se pueden almacenar durante varios meses sin perder su estabilidad y eficacia funcional. Tal y como se describe a continuación en el ejemplo 5, los complejos y las nanopartículas de la invención se pueden liofilizar de forma ventajosa en presencia de un azúcar. Ejemplos no limitativos de azúcares que se pueden usar para ese fin son sacarosa, glucosa, manitol y una mezcla de los mismos, y se pueden usar, 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 solución antes de la liofilización.

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

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 una nanopartícula que tiene un péptido dirigido a interacciones proteína/proteína, que implica como carga una proteína esencial CDK y Ciclina requeridas para la progresión del ciclo celular, y una molécula dirigida a una diana específica de células tumorales (por ejemplo: péptido RGD, ácido fólico, anticuerpos o nanocuerpos de MUC-1 o HEK2), forma parte de la presente invención. Dependiendo de la aplicación, esta composición se puede formular para una administración intravenosa, intratumoral, tópica, intrarrectal, intranasal, transdérmica o intradérmica, o para una administración a través de un vaporizador bucal, o para una administración como implante subcutáneo para la 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 una 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).

45 Ejemplos

Ejemplo 1: Materiales y Métodos

Péptidos VEPEP-9

Todos los péptidos fueron sintetizados mediante síntesis de péptidos en fase sólida usando resina AEDI-expensina con (fluorenilmetoxi)-carbonilo (Fmoc) en un sintetizador de péptidos Pioneer (Pioneer®, Applied Biosystems, Foster City, CA) partiendo de resina Fmoc-PAL-PEG-PS a 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 escisión final de la resina se llevaron a cabo con TFA/Fenol/H₂O/Tioanisol/Etanoditiol (82,5/5/5/5/2,5%) durante 3 h y 30 minutos. Todos los péptidos presentaban un grupo cisteamida en el extremo C-terminal y estaban acetilados en el extremo N-terminal. La síntesis de péptidos comenzó en el extremo C-terminal, usando una resina AEDI-expensina a partir de un enlace de cisteamida, tal como describen Mery et al., 1992. Todos los péptidos contenían una beta-Alanina o una serina en el extremo N-terminal para favorecer cualquier funcionalización posterior sin usar el grupo cisteamida C-

terminal.

Funcionalización de VEPEP-9

Se usaron dos estrategias para la funcionalización de péptidos:

5 (1) 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 necesaria para estabilizar la partícula a través de enlaces disulfuro (SH-SH). Los péptidos funcionalizados se purificaron adicionalmente mediante HPLC de fase inversa y se analizaron mediante espectroscopia de masas de ionización por electropulverización.

10 (2) También se llevaron a cabo configuraciones de péptido a través de un enlace disulfuro usando el grupo SH del resto cisteamida del péptido.

VEPEP-9-Funct-1: X-LRWWRWASRW(A-F)SRWAW(W-F)R-CH₂-CH₂-SH (SEQ ID No: 13)

VEPEP-9-Funct-2: Ac-LRWWRWASRW(A-F)SRWAW(W-F)R-CH₂-CH₂-S-S-X (SEQ ID No: 14)

VEPEP-9-Funct-3: X-WWGSWATPRRRWWR-CH₂-CH₂-SH (SEQ ID No: 15)

VEPEP-9-Funct-4: Ac-WWGSWATPRRRWWR-CH₂-CH₂-S-S-X (SEQ ID No: 16)

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

Estructura de VEPEP-9

20 Los péptidos VEPEP-9, excepto VEPEP-9c y VEPEP-9e, son péptidos anfipáticos secundarios; son altamente versátiles y muestran un fuerte polimorfismo estructural. Los VEPEP-9 no están plegados en solución como forma libre y adoptan una conformación de hélice alfa en presencia de membranas celulares de lípidos o artificiales, así como en presencia de cargas tales como un péptido, SMH y oligonucleótido pequeño (Figura 1, en la que "H" significa "hélice" y "t" "giro"). En contraste, VEPEP-9c y VEPEP-9e adoptan una organización de bobina/giro debido a la presencia del residuo de prolina en la secuencia. El dominio N-terminal de VEPEP-9c adopta una conformación alfa helicoidal en presencia de membranas celulares de lípidos o artificiales, así como en la presencia de cargas.

25 Péptidos

Los péptidos dirigidos a CDK/ciclina (C4: KKQVRMAHLVLT (SEQ ID No: 50)), versión lineal o cíclica se obtuvieron para el polipéptido. Los péptidos marcados con fluorescencia (CY3 y CY5) tripéptidos (GWSC-colorante (SEQ ID No: 51)) y tetrapéptidos (GWASC-colorante (SEQ ID No: 52)) también fueron obtenidos para el polipéptido.

Oligonucleótidos y ARNsi

30 Los ARNsi y ARNsi marcado con fluorescencia con 5' Alexa⁷⁰⁰ o fluoresceína (5'-FAM) fueron sintetizados por Eurogentec (Bélgica) de acuerdo con las siguientes secuencias:

cyc-B1 sentido	5'GGCGAAGAUAACAUGGCATT3' (SEQ ID No: 17)
Cyc-B1 antisentido	5'UGCCAUGUUGAUCUJCGCCTT3' (SEQ ID No: 18)
cyc-B3 sentido	5'GGUGAAGAUCAGCAUGGCATT3' (SEQ ID No: 19)
Cyc-B3 antisentido	5'UGCCAUGUCGAUCUJCACCTT3' (SEQ ID No: 20)
GAPDH sentido	5'CAUCAUCCUGCCUCUACUTT-3' (SEQ ID No: 21) y
GAPDH antisentido	5'AGUAGAGGCAGGGAUGAUG3' (SEQ ID No: 22)

Los oligonucleótidos cortos y PNA también se obtuvieron en Eurogentec:

ODN1: AGCTTAGCTT-Cy5 (SEQ ID No: 23)

35 Cyc-B1a; TGCCATCGGGCTTGG-Cy5 (SEQ ID No: 24)

Valoraciones de la fluorescencia

40 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-9 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 con FITC o CY5 del péptido marcado o del oligonucleótido se excitó a 492 nm y la emisión se registró entre

500 y 580 nm. Para la interacción VEPEP-9/péptido, se valoraron 0,5 μM del péptido marcado con FITC con concentraciones crecientes de VEPEP-9. Para la interacción VEPEP-9/oligonucleótido, se valoraron 200 nM de oligodesoxinucleótido marcado con FITC o Cy5 (ODN) con concentraciones crecientes de VEPEP-9. Todas las mediciones fueron corregidas para la dilución y el ajuste de la curva se realizó mediante el programa informático Grafit (Eri-

5

Caracterización de nanopartículas basadas en péptidos

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

Cultivo celular y administración de la carga mediada por VEPEP

10 Se cultivaron líneas celulares adherentes de fibroblastos HS68, HeLa, PC3, MCF-7, SCK3-Her2, PBMC (de la "American Type Culture Collection" (ATCC)) en medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con glutamina 2 mM, un 1% de antibióticos (estreptomicina 10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, penicilina, 10.000 UI/mL) y un 10% (p/v) de suero fetal de ternera (FCS), a 37°C en una atmósfera humidificada y con un 5% de CO_2 . Se prepararon soluciones de reserva de partículas de VEPEP-9/péptido formando un complejo con péptido 1 μM y péptidos VEPEP-9 en una relación molar de 1/20 durante 30 minutos a 37°C. Mediante dilución en serie de los complejos de reserva en PBS, se obtuvieron concentraciones menores de vehículo VEPEP-9/péptido (de 500 nM a 1 μM), con el objetivo de conservar la misma relación vehículo VEPEP-9/péptido. Se prepararon soluciones de reserva de partículas de VEPEP-9/ARNsi formando un complejo con ARNsi 100 nM y péptidos VEPEP-9 en una relación molar de 1/20 durante 30 minutos a 37°C. Concentraciones más bajas de VEPEP-9/ARNsi (de 20 nM a 0,125 nM) se obtuvieron mediante dilución en serie de los complejos de reserva en PBS, con el fin de conservar la misma relación de VEPEP-9/ARNsi. Se cultivaron 150.000 células sembradas en una placa de 35 mm el día antes de la transfección, hasta un 60% de confluencia y se recubrieron con 200 μL de los complejos formados previamente, 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 de nuevo aporte que contenía un 16% de suero fetal de ternera (FCS) con el fin de alcanzar una concentración final de FCS del 10%, sin eliminar el recubrimiento de los complejos VEPEP-9/carga. Se devolvieron las células a la incubadora durante 24 horas. Para los péptidos derivados de cdk2, se supervisó la proliferación celular después de 24 y 48 h. Para el ARNsi dirigido a Ciclina B1, el nivel de ARNm de ciclina B1 se determinó 24 horas después de la transducción, utilizando Quantigen (Panomics Inc.). Los datos reportados son una media de 3 o 4 experimentos distintos.

15

20

25

Citotoxicidad

30 La toxicidad de los complejos VEPEP-9/péptido o VEPEP-9/ODN se investigó en líneas celulares Hela y HS-68. Se incubaron 30.000 células sembradas en placas de 24 pocillos el día antes de la transfección con concentraciones crecientes de péptido u ODN formando un complejo con VEPEP-9 en una relación molar de 20/1 que oscilaba entre 1 y 5 μM (VEPEP-9 500 μM), durante 30 minutos, antes de la adición de medio para alcanzar una concentración final del 10% de FCS. Se midió la respuesta citotóxica 12 h o 24 h después de supervisar el nivel de ARNm de gen ciclofilina constitutivo (Quantigen, Panomic Inc.) y mediante un ensayo MTT colorimétrico (Sigma, Alemania), respectivamente. Para el ensayo MTT, el medio del cultivo celular se retiró y se sustituyó con PBS que contenía 2,5 mg/mL de MTT durante 4 h. Los resultados corresponden a la media de 3 experimentos distintos.

35

Modelos de tumor en ratón

40 Se inoculó subcutáneamente a ratones hembra sin pelo atímicos (de 6-8 semanas de edad) en el costado 1 x 10^6 células PC3, A549 o SCK-3-HEK2 en 100 μL de PBS.

Para los tratamientos con péptido: de dos a tres semanas después del implante del tumor, cuando el tumor había alcanzado un tamaño de aproximadamente 100 mm^3 , los animales fueron tratados mediante inyección intratumoral o intravenosa, cada 3 días, con una solución de 0,1 mL de péptido libre obtenido a partir de Cdk2 (200 μg), péptidos C2S desordenados de control (VTLMEAKKQVLT (SEQ ID No: 53)) o péptidos C2 (KKQVLAMEHLVT (SEQ ID No: 54)) (10, 50, 100 μg) formando un complejo con NANOPEP-9 en una relación molar de 1/20.

45

Para los tratamientos con molécula pequeña: de dos a tres semanas después de la implantación del tumor, cuando el tamaño del tumor había alcanzado aproximadamente 100 mm^3 , los animales fueron tratados mediante inyección intratumoral o intravenosa, cada 3 días, con una solución de 0,1 ml de daunomicina libre (1 mg), o daunomicina (0,1, 0,2 mg) formando un complejo con NANOPEP-9 en una relación molar de 1/30 o formulaciones que contenían 15% de PEG-NANOPEP-9 en la superficie.

50

Para el tratamiento con ARNsi: de dos a tres semanas después de la implantación del tumor, cuando el tamaño del tumor había alcanzado aproximadamente 100 mm^3 , los animales fueron tratados mediante inyección intratumoral o intravenosa, cada 3 días, con una solución de 0,1 ml de ARNsi de Cyc-B1 libre (50 o 100 μg), ARNsi de Cyc-B3 de control o ARNsi de Cyc-B1 (1, 5, 10 μg) que formaba un complejo con NANOPEP-9 en una relación molar de 1/20.

55 Para el tratamiento con PNA: de dos a tres semanas después de la implantación del tumor, cuando el tamaño del tumor había alcanzado aproximadamente 100 mm^3 , los animales fueron tratados mediante inyección intratumoral o

intravenosa, cada 3 días, con una solución de 0,1 ml de PNA de Cyc-B1 libre (50 o 100 µg), o PNA de Cyc-B1 (1, 5, 10 µg) formando un complejo con NANOPEP-9, o NANOPEP-9/PEG-NANOPEP-9 en una relación molar de 1/20. Las formulaciones que contenían 15% de PEG-NANOPEP-9 fueron preparados de una manera escalonada formando en primer lugar un complejo previo de NANOPEP-9/PNA en una relación molar de 1/20, seguido de la adición de PEG-NANOPEP-9 con el fin de aumentar la relación de PNA/vehículo a 1/25.

Se midió el diámetro tumoral en dos direcciones a intervalos regulares usando un calibrador 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 la prueba t de Student y se consideró que $p < 0,05$ era estadísticamente significativo.

Obtención de imágenes in vivo de la biodistribución de péptido/ARNsi

Se obtuvieron imágenes con fluorescencia *in vivo* como se ha descrito previamente en Crombez et al., 2009, Nucleic Acid Res [10]. A los ratones se les inyectó intravenosamente 100 µg (200 µL) de péptido (C4 o tetrapéptido: GWASC, SEQ ID No: 52) marcado fluorescentemente con Alexa700 o ARNsi o bien desnudo o formando un complejo con VEPEP-9 (n = 4 animales por grupo). Los ratones anestesiados, usando isoflurano al 2%, fueron iluminados mediante diodos emisores de luz a 663 nm, equipados con filtros de interferencia, y se grabaron películas durante los primeros 15 minutos y las imágenes con 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., *supra*). A las 24 h, los ratones fueron sometidos a eutanasia y se extrajeron diferentes órganos para cuantificar la fluorescencia con Alexa.

Ejemplo 2: Aplicaciones de péptidos VEPEP-9 para la administración de moléculas

Ejemplo 2.1: los péptidos VEPEP-9 forman nanoestructuras estables con cargas

El péptido VEPEP-9 forma complejos estables con péptidos y ODN. La unión de cargas a VEPEP-9 se supervisó mediante espectroscopia de fluorescencia usando los dos grupos Trp intrínsecos de VEPEP-9 (residuos Trp 3 a 5) y cargas extrínsecas marcadas con fluorescencia (usando Cy3, Cy5 o FITC). El ajuste de la curva revela que VEPEP-9 se une fuertemente a las diferentes cargas con una constante de disociación en el rango nanomolar (Tablas 1 y 2 y Figura 2).

Los péptidos VEPEP-9 forman partículas estables con diferentes cargas incluyendo péptido, ARNsi, PNA y molécula aromática pequeña (Figura 2). La constante de disociación para el péptido, ARNsi, PNA y molécula hidrófoba pequeña oscila entre 10-100 nM, 5-50 nM, 5-50 nM y 0,02 a 0,2 µM, respectivamente, dependiendo de la naturaleza de los colorantes y de las cargas.

Tabla 1: Caracterización de los complejos de VEPEP-9/carga. Péptido (C4), ARNsi, PNA (PNA de 15 unidades) y molécula hidrófoba pequeña.

VEPEP-9	Cargas							
	péptido		ARNsi		PNA		SHM	
	Unión	Kd (nM)	Unión	Kd (nM)	Unión	Kd (nM)	Unión	Kd (M)
VEPEP-9a:	sí	10-100	sí	5-50	Sí	5-50	Sí	0,02-0,1
VEPEP-9b	sí	10-100	sí	5-50	Sí	5-50	Sí	0,02-0,1
VEPEP-9c:	sí	10-100	sí	5-50	Sí	5-50	Sí	0,02-0,1
VEPEP-9d:	sí	10-100	sí	> 200	Sí	> 50	Sí	0,02-0,1
VEPEP-9e	sí	10-100	sí	5- 50	Sí	5-50	Sí	0,02-0,1
VEPEP-9f:	sí	10-100	sí	> 200	Sí	> 50	Sí	0,02-0,1

La unión de cargas de moléculas pequeñas se ha investigado en detalle en función de la naturaleza de la SHM. Se han empleado diversas moléculas hidrófobas (daunomicina, paclitaxel, doxorubicina, porfirina), así como moléculas cargadas (nucleótido, nucleósido y colorantes fluorescentes).

Tabla 2: Caracterización de complejos de VEPEP-9/carga. SHM: moléculas hidrófobas pequeñas (porfirina, FAM-G, AZT, doxorubicina)

VEPEP-9	Cargas							
	Doxorrubicina		Porfirina		AZT		FAM-guanosina	
	Unión	Kd (µM)	Unión	Kd (µM)	Unión	Kd (µM)	Unión	Kd (µM)
VEPEP 9a:	sí	0,02	sí	0,4	sí	0,4	sí	0,02
VEPEP-9b	sí	0,07	sí	0,5	sí	0,5	sí	0,3
VEPEP-9c:	sí	0,01	sí	0,08	sí	0,03	sí	0,09
VEPEP-9d:	sí	0,09	sí	0,25	sí	0,02	sí	0,4
VEPEP-9e	sí	0,05	sí	0,20	sí	0,09	sí	1,1
VEPEP-9f:	sí	0,01	sí	0,11	no	-	sí	0,8

Ejemplo 2.2: Los péptidos VEPEP-9 forman nanopartículas estables con sus diferentes cargas

5 El tamaño de las partículas se supervisó mediante dispersión de luz dinámica. Para todos los péptidos VEPEP-9, la relación molar de péptido VEPEP-9/carga óptima oscila entre 1/5 y 1/30 (Figura 3). El tamaño de las partículas es de aproximadamente 50 a 200 nanómetros de diámetro.

Ejemplo 3: Aplicaciones de VEPEP-9 en células cultivadas

Ejemplo 3.1: Administración mediada por VEPEP-9 de péptido y ARNsi en diferentes líneas celulares

10 Se han usado los péptidos VEPEP-9 para la administración de diferentes péptidos y ARNsi en diferentes líneas celulares, que incluyen líneas celulares primarias, líneas de células madre y líneas celulares estimulantes. La administración de péptido o ARNsi se supervisó usando dos estrategias: espectroscopia de fluorescencia y supervisando las respuestas biológicas (respuestas de antiproliferación y desactivación relacionada con ARNsi).

15 1- El péptido marcado con fluorescencia se visualizó en las diferentes líneas celulares usando microscopía de fluorescencia o clasificación FACS (Tabla 3). En la mayoría de las líneas celulares, la captación de péptidos marcados con Cy-5 es superior al 70% de las células.

2- Los experimentos de dosis-respuesta llevados a cabo en diferentes células cultivadas revelaron que la administración mediada por VEPEP-9 de péptidos C4, dirigidos al complejo de cdk2/ciclina A, bloquea la proliferación celular de diferentes células cancerosas (Figura 4).

20 3- Los experimentos de dosis-respuesta llevados a cabo con diferentes células cultivadas revelaron que la administración mediada por VEPEP-9 de ARNsi (GAPDH) inducía una regulación a la baja fuerte del nivel de ARNm de GAPDH (Tabla 3). En la mayoría de las líneas celulares, se obtuvo una desactivación (KO, del inglés “knockdown”) superior al 70% a nivel de proteínas.

Tabla 3: Los resultados anteriores se obtuvieron usando VEPEP-9a para la administración de péptidos y VEPEP-9c para la administración de ARNsi. Se obtuvieron resultados similares utilizando otras variantes de VEPEP-9.

Líneas celulares	origen	Eficacia de FACS de Cy-5 C4	Eficacia de KO de GAPDH
Hela	células de cáncer cervical epitelial humano	70%	90%
STEM-CE	células madre embrionarias de ratón	70%	65%
Jurkat	linfocitos T humanos	90%	90%
HepG2	hepatocitos humanos	70%	70%
C2C12	mioblastos de ratón	80%	90%
MEF	fibroblastos de ratón	75%	80%
HS-68	fibroblastos humanos	90%	80%
CEM-SS	macrófagos humanos	60%	70%
U2OS	osteoblastos humanos	91%	91%
MCF7	adenocarcinoma de mama humano	70%	70%
MT4	linfocitos T humanos	75%	70%

Líneas celulares	origen	Eficacia de FACS de Cy-5 C4	Eficacia de KO de GAPDH
HER2	cáncer de mama humano	90%	90%
MDA-MB	cáncer de mama humano	70%	70%
PBMC	macrófagos humanos	90%	90%

Ejemplo 3.2: la administración mediada por VEPEP-9 de péptidos dirigidos a Cdk2/ciclina A o ARNsi que se dirige a ciclina B1 induce la detención en G2 y bloquea la proliferación de células cancerosas

5 Los experimentos de dosis-respuesta llevados a cabo en células cultivadas revelaron que la administración mediada por VEPEP-9 de péptido C4 y ARNsi (que se dirige a ciclina B1: Cyc-B1) inducía una respuesta biológica fuerte asociada con una detención específica del ciclo celular en G2.

10 Para la administración del péptido se emplearon los vectores VEPEP-9a y VEPEP-9f. Una concentración de péptido C4 de 200 nM fue suficiente para bloquear la proliferación de células Hela, MCF7, HEK-2 y U2OS. Se estimaron valores de CI_{50} de 45 ± 20 nM y 56 ± 12 nM, en células Hela y MCF7, respectivamente. Para la administración de ARNsi, se utilizaron VEPEP-9b y VEPEP-9e. Una concentración de ARNsi de 20 nM era suficiente para bloquear la proliferación de las células Hela, MCF7, HEK-2 y U2OS. Unas CI_{50} de $3,1 \pm 0,2$ nM, $1,6 \pm 0,5$ nM y $4,2 \pm 1,2$ nM se estimaron en Hela, MCF7 y HEK-2, respectivamente. En contraste, tanto para la administración de ARNsi como de C4, la proliferación solamente se redujo en un 10% en los fibroblastos HS68 no transformados (Figura 5), en perfecta consonancia con el impacto del punto de control G2-M sobre la proliferación del ciclo celular y que muestra la especificidad del péptido hacia las células cancerosas.

15 La disociación mediada por C4 del complejo CDK2/ciclina A se asociaba directamente con la acumulación de células con un contenido en 4N, lo que está de acuerdo con la regulación a la baja de la actividad de Cdk1-Ciclina B1, y se obtuvo de forma óptima con péptido 200 nM y con valores de CI_{50} estimados en 42 ± 12 nM y 52 ± 15 nM para las células HeLa y MCF7, respectivamente (Figura 6). Por el contrario, no se observó ningún efecto sobre la progresión del ciclo celular con 500 nM de péptido C4 desordenado que formaba un complejo con VEPEP-9 en una relación de 20/1, o solo con vehículo VEPEP-9a o VEPEP-9f (200 μ M).

20 La reducción mediada por ARNsi de los niveles de proteína ciclina B1 se asoció directamente con una acumulación de células con un contenido en 4N, de conformidad con la regulación a la baja de la actividad de Cdk1-Ciclina B1, y se obtuvo de manera óptima con ARNsi 20 nM y valores de CI_{50} estimados en $2,4 \pm 0,8$ nM, $1,9 \pm 0,9$ nM y $1,2 \pm 0,6$ nM para HeLa, MCF7 y HEK-2, respectivamente (Figura 7). En contraste, no se observó ningún efecto sobre los niveles de ciclina B1 y la progresión del ciclo celular con 200 nM de un ARNsi no relacionado (si-GAPDH), o de un ARNsi desapareado que albergaba dos mutaciones (Cyc-B3) que formaba un complejo con VEPEP-9 en una relación de 20/1, o solo con vehículo VEPEP-9b y VEPEP-9e (100 μ M).

Ejemplo 3.3: Administración mediada por VEPEP-9 de péptidos pequeños en diferentes líneas celulares

30 VEPEP-9a, VEPEP-9c y VEPEP-9f se han utilizado para la administración de péptidos pequeños en diferentes líneas celulares, incluyendo líneas celulares primarias, líneas de células madre y líneas celulares estimulantes. La captación de las cargas se supervisó utilizando espectroscopía de fluorescencia y análisis FACS. Los péptidos marcados con fluorescencia se visualizaron en las diferentes líneas celulares utilizando microscopía de fluorescencia o clasificación FACS (Tabla 4). En la mayoría de las líneas celulares, la captación de péptido marcado con Cy-5 es en más del 70% de las células.

Tabla 4

Líneas celulares	origen	Eficacia de VEPEP-9a	Eficacia de VEPEP-9c	Eficacia de VEPEP-9f
Hela	células de cáncer cervical epitelial humano	70%	80%	60%
Jurkat	linfocitos T humanos	65%	57%	65%
STEM	células madre embrionarias de ratón	51%	87%	76%
HepG2	hepatocitos humanos	71%	75%	48%
C2C12	mioblastos de ratón	59%	90%	57%
MEF	fibroblastos de ratón	65%	65%	75%
HS-68	fibroblastos humanos	77%	81%	67%

Líneas celulares	origen	Eficacia de VEPEP-9a	Eficacia de VEPEP-9c	Eficacia de VEPEP-9f
CEM-SS	macrófagos humanos	52%	80%	87%
U2OS	osteoblastos humanos	79%	78%	57%
MCF7	adenocarcinoma de mama humano	67%	72%	89%
MT4	linfocitos T humanos	52%	47%	56%

Ejemplo 3.4: La administración mediada por VEPEP-9 de péptidos y ODN no es tóxica.

5 Tal como se muestra en la Figura 8, se investigó la toxicidad de las partículas VEPEP-9 en células HeLa, U2OS y STEM ES mediante un ensayo MTT y supervisando el nivel de ARNm de ciclofilina medido mediante tecnología quantigen® (Affymetrix). No se detectó toxicidad a niveles de hasta 200 nM, y solo se observó una toxicidad moderada con la concentración máxima de 1 µM.

Ejemplo 3.5: Administración mediada por VEPEP-9 de una molécula de PNA en diferentes líneas celulares

10 Se han usado péptidos VEPEP-9 para la administración de análogos de ácido nucleico (PNA y morfolino) a diferentes líneas celulares, que incluyen líneas celulares primarias y líneas celulares estimulantes. Hemos demostrado que VEPEP-9a y VEPEP-9c y VEPEP-9f forman complejos estables con PNA pequeño o con oligonucleótido de morfolino de 15 unidades y los hemos utilizado para la administración de PNA a diferentes líneas celulares, incluyendo líneas celulares primarias, líneas de células madre y líneas celulares estimulantes. La captación se supervisó utilizando espectroscopía de fluorescencia y realizando un seguimiento de la respuesta biológica (desactivación de la ciclina B1).

15 El PNA marcado con fluorescencia se visualizó en las diferentes líneas celulares usando microscopía de fluorescencia o clasificación FACS (Tabla 5). En la mayoría de las líneas celulares, la captación de PNA marcado con Cy-5 es en más del 60% de las células.

Tabla 5

Líneas celulares	origen	Eficacia de VEPEP-9a	Eficacia de VEPEP-9c	Eficacia de VEPEP-9f
HeLa	células de cáncer cervical epitelial humano	67%	82%	78%
Jurkat	linfocitos T humanos	55%	77%	81%
STEM	células madre embrionarias de ratón	72%	76%	88%
HepG2	hepatocitos humanos	81%	84%	71%
C2C12	mioblastos de ratón	65%	89%	69%
MEF	fibroblastos de ratón	60%	76%	74%
HS-68	fibroblastos humanos	87%	91%	71%
CEM-SS	macrófagos humanos	47%	67%	78%
U2OS	osteoblastos humanos	64%	71%	89%
MCF7	adenocarcinoma de mama humano	78%	78%	83%
MT4	linfocitos T humanos	76%	54%	67%

20 A continuación, aplicamos una estrategia de VEPEP-9a y VEPEP-9f para la administración de PNA antisentido dirigido a Ciclina B1 como se ha descrito anteriormente (Morris et al., 2007). Experimentos de dosis-respuesta realizados sobre diferentes células cultivadas, revelaron que la administración mediada por VEPEP-9 de PNA (ciclina B1) inducía una regulación a la baja fuerte mayor que el 70% del nivel de proteína ciclina B1 en las células HeLa y MCF7 y no se observó ningún cambio en el nivel de ciclina B1 con PNA libre y molécula de PNA desordenada que formaban un complejo con el vehículo VEPEP-9 (Figura 9).

25

Ejemplo 3.6: Administración mediada por VEPEP-9 de moléculas hidrófobas pequeñas en diferentes líneas celulares

Se han usado péptidos VEPEP-9 (variantes de VEPEP-9a, b, d, f) para la administración de diferentes moléculas hidrófobas y cargadas fluorescentes pequeñas, así como doxorubicina/porfirina/taxol en diferentes líneas celulares,

que incluyen líneas celulares primarias y líneas celulares estimulantes. Los péptidos VEPEP-9 forman partículas estables con moléculas aromáticas pequeñas que incluyen doxorubicina o colorantes fluorescentes (Figura 10). La constante de disociación para las moléculas hidrófobas pequeñas oscila entre 0,01 y 2 μM , dependiendo de la naturaleza de los colorantes y de la molécula.

- 5 El efecto de la administración mediada por VEPEP-9 de doxorubicina, porfirina o taxol ha sido investigado en la viabilidad de células cancerosas, las diferentes SMHs formaron complejos con el péptido VEPEP-9 con una relación molar de 1/20. El impacto de los péptidos vehículos para mejorar la captación celular de fármacos de molécula pequeña se estimó realizando un seguimiento de la inhibición de la proliferación de células cancerosas. Experimentos de dosis-respuesta llevados a cabo en cultivos celulares revelaron que la administración mediada por VEPEP-9 de doxorubicina, porfirina y taxol inducía una respuesta biológica asociada con la detención del ciclo celular y a una disminución de la viabilidad de células cancerosas MCF-7 y SCK-3-HEK2 (Figura 10).

En la Tabla 6 se presentan los valores de CI_{50} . Una comparación de la administración de fármacos mediada por VEPEP-9 con la respuesta obtenida con el fármaco libre, demostraba que Doxo, porfirina y taxol son entre 25 y 50 veces más eficaces cuando forman un complejo con VEPEP-9.

15 Tabla 6

Fármaco	CI_{50} de VEPEP-9a (μM)	CI_{50} de VEPEP-9b (μM)	CI_{50} de VEPEP-9d (μM)	CI_{50} de VEPEP-9f (μM)	CI_{50} sin fármaco (μM)
Doxo (SKB3)	0,2	0,3	0,4	0,6	10
Doxo (MCF7)	0,1	0,2	0,17	0,7	9
Porfirina (MCF7)	0,8	1,4	0,54	1,2	25
Porfirina (SKB3)	1,2	0,9	0,87	1,4	17
Taxol (MCF7)	0,8	0,12	0,5	0,8	7
Taxol (SKB3)	0,7	0,65	0,7	0,9	10

Ejemplo 4: Formulaciones de NANOPEP-9 y aplicaciones para la administración *in vivo*

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

Las partículas NANOPEP se forman en un procedimiento de dos etapas (Figura 11): primero el "núcleo" con una relación molar de 1/5 o 1/10, después la parte "periférica" en una relación molar de 1/20 hasta 1/80. La organización multicapa de la partícula permite su funcionalización orientada, que se elige dependiendo de la naturaleza de la diana celular/tejido y del modo de administración.

Se ha establecido un protocolo de tres etapas (Figura 11) cuando la funcionalización de la partícula tiene lugar a través de ácido nitrilotriacético (NTA) ligado al VEPEP-9. Es bien sabido que el grupo NTA es capaz de quelar metal e interaccionar fuertemente con una proteína marcada con histidina. El recubrimiento de las partículas con VEPEP-9 funcionalizado con NTA permite la fijación a la partícula de cualquier proteína que albergue un marcador de histidina. Esta estrategia ofrece la ventaja principal de presentar partículas comunes con 2 capas "NANOPEPHIS" que se pueden asociar a cualquier proteína marcada con His. La estrategia de NANOPEPHIS ha sido usada para recubrir las partículas con un anticuerpo específico dirigido a un antígeno de la superficie celular (EGF, HER-2 o MUC1) o un nanocuerpo seleccionado mediante presentación en fagos contra una línea celular específica para la administración dirigida de un péptido. La estrategia NANOPEPHIS-9 se puede emplear universalmente con cualquier péptido y proteína que alberga una agrupación de Histidina en su secuencia.

Ejemplo 5: Aplicación *in vivo* de la estrategia NANOPEP-9

Se ha usado la estrategia NANOPEP-9 para la administración *in vivo* y la orientación de diferentes cargas y diferentes nanopartículas a base de péptidos. Diferentes ejemplos de aplicaciones de NANOPEP-9 se han descrito desde

entonces para un péptido (5.1), ARNsi (5.2), PNA (5.3) y molécula pequeña (5.4).

Ejemplo 5.1: Administración dirigida *in vivo* de péptido corto mediada por NANOPEP-9 después de inyecciones sistémicas intravenosas o tópicas

Formulaciones de NANOPEP-9/péptido para la administración in vivo

5 El potencial terapéutico de la tecnología NANOPEP-9 ha sido validado *in vivo* con péptidos dirigidos a CDK2/CICLINA A/E, una proteína cinasa esencial requerida para el control de la progresión del ciclo celular a G1 y G2, y una diana terapéutica establecida en varios cánceres. La potencia de esta tecnología ha sido validada *in vivo* con péptidos dirigidos a una interacción entre la proteína cinasa y sus reguladores de ciclina, requeridos para la entrada y la progresión a través de la mitosis. El péptido C4 combinado con NANOPEP (VEPEP-9a o VEPEP-9f)
10 evita el crecimiento de tumores de pulmón y próstata en modelos de xenoinjerto en ratón, después de una inyección cada tres días de NANOPEP-9/C4 a 1 mg/kg (Figura 12). La envoltura del “núcleo” de las partículas se formó usando péptidos VEPEP-9a o VEPEP-9f en una relación molar de 20/1 con péptidos C4. Los péptidos VEPEP-9 se solubilizaron en agua y la solución de reserva de péptido se sometió a ultrasonidos durante 10 minutos en un baño de agua antes de la formación de los complejos. A continuación, se formaron los complejos VEPEP-9/péptido añadiendo péptido C4 en la solución de péptido e incubando a 37°C durante 20-30 minutos para permitir que se formaran los complejos de péptido vehículo/péptido. Después se recubrieron las partículas con péptidos VEPEP-9a (NANOPEP-9a) o VEPEP-9f (NANOPEP-9f).

La estabilidad de las formulaciones de fármaco-vehículo *in vivo* y en la circulación sanguínea es un problema importante para la administración sistémica de agentes terapéuticos. Con el fin de mejorar la biodisponibilidad y la estabilidad de las partículas NANOPEP-9/péptido, se recubrieron con PEG-VEPEP-9, haciendo de este modo que fueran más adecuadas para la administración sistémica. La capa superficial de las partículas NANOPEP-9 se funcionalizó con un resto PEG en el extremo N-terminal de VEPEP-9 (PEG-VEPEP-9a), mediante la activación del grupo amino beta alanina N-terminal. Las partículas NANOPEP-9a pegilado/C4 se obtuvieron por etapas mediante la formación de complejos de moléculas VEPEP-9a con C4 en una relación molar de 15/1, seguido por el recubrimiento de las partículas con una segunda capa de PEG-VEPEP-9a en una relación de 1/10 y luego incubando durante 20 minutos a 37°C para la obtención de complejos estables (véase la Figura 11). Las partículas se pueden liofilizar para un almacenamiento a largo plazo; en ese caso, 5 a 20% de glucosa o de manitol se añade a la solución de las partículas antes de la liofilización para estabilizar las partículas durante el proceso. Antes de la administración, las partículas se han diluido en condiciones fisiológicas, en presencia de 0,9% de NaCl y 5 a 20% de glucosa o manitol. Después del procedimiento de preparación, más del 95% de los péptidos C4 se encuentran atrapados en las nanopartículas, y las partículas son estables durante más de 9 meses a 4°C, 20°C, -4°C y -80°C.

Administración de NANOPEP-9/C4 después de una inyección tópica y sistémica

El potencial de NANOPEP-9 para administrar un péptido C4 *in vivo* se evaluó primeramente en ratones con xenoinjertos de tumores PC3 y SKB3-HEK2 de células de carcinoma de próstata humana (Figura 12). Se evaluó el efecto de la administración intratumoral local e intravenosa sistémica de partículas NANOPEP-9a/C4 o NANOPEP-9f/C2 (relación molar de 20/1) sobre el crecimiento de tumores subcutáneos establecidos. El día 50, el tamaño de los tumores en la cohorte de control, inyectada con PBS, había aumentado aproximadamente 4,0 veces. Después de un tratamiento intratumoral local, cada cuatro días, se observaron reducciones del crecimiento tumoral del 70% y el 65% usando 100 µg (0,5 mg/kg) de C4/NANOPEP-9a y C4/NANOPEP-9f, para PC3 y SKB3-HEK2, respectivamente. En ambos casos, el crecimiento del tumor se inhibió completamente con 200 µg (1 mg/kg) de C4/NANOPEP-9a y C4/NANOPEP-9f (Figura 12).

Después de una administración intravenosa sistémica, se observaron reducciones del crecimiento tumoral del 45% y 30%, utilizando 200 µg (1 mg/kg) de C4/NANOPEP-9a y C4/NANOPEP-9f, respectivamente. En contraste, cuando el péptido C4 está asociado con partículas de NANOPEP-9a funcionalizadas, su potencia para inhibir el crecimiento del tumor después de la administración intravenosa sistémica mejora significativamente. Se inyectaron por vía intravenosa 100 µg (0,5 mg/kg) de péptido C4 que formaba un complejo con PEG-NANOPEP-9f en una relación de 1/20, cada tres días en ratones portadores de tumores xenoinjertados PC3 o SKB3-HEK2 y se observó una reducción significativa en el tamaño del tumor del 90% el día 50 (Figura 12), que es de 10 a 20 veces más potente que la nanopartícula NANOPEP-9 no funcionalizada, lo que sugiere que PEG incrementa la biodistribución del péptido en el tumor, manteniendo el péptido en el plasma y estabilizando la partícula de NANOPEP-9.

En ambos casos, la inhibición del crecimiento tumoral era específica de la secuencia de C4 ya que los péptidos C4S desordenados o que formaban un complejo con NANOPEP-9a o NANOPEP-9f e inyectados en ratones a 2 mg/kg, eran incapaces de inhibir el crecimiento tumoral. Los resultados demostraban que las partículas de NANOPEP-9 son menos eficaces a través de una inyección sistémica, lo que se debe probablemente a una menor estabilidad de la partícula en la sangre (véase más adelante).

Ejemplo 5.2: administración dirigida *in vivo* de ARNsi mediada con NANOPEP-9 después de inyecciones intravenosas sistémicas o tópicas

La combinación de ARNsi de ciclina B1 con NANOPEP-9 impide el crecimiento de tumores de pulmón, de ovario y de próstata en modelos de xenoinjertos en ratón, después de una inyección cada tres días de complejos de NANOPEP-9/ARNsi (Figura 13).

5 A ratones desnudos hembras atímicos (6-8 semanas de edad) se les inoculó subcutáneamente en el flanco 1×10^6 células PC3 (cáncer de próstata), A549 (cáncer de pulmón) o SCK-3-HEK2 (cáncer de ovario) en 100 μ l de PBS. De dos a tres semanas después de la implantación del tumor, cuando el tamaño del tumor había alcanzado aproximadamente 100 mm³, los animales fueron tratados mediante inyección intratumoral o intravenosa, cada 3 días, con una solución de 0,1 ml de o bien ARNsi de Cyc-B1 libre (50 o 100 μ g), ARNsi de Cyc-B3 de control o ARNsi de Cyc-B1 (5, 10 μ g) formando un complejo con partículas NANOPEP-9b o NANOPEP-9e. Se formó la envoltura del "núcleo" de las partículas usando el péptido VEPEP-9b o VEPEP-9e en una relación molar de 20/1 con un ARNsi dirigido a ciclina B1. Las soluciones de reserva de ARNsi están en tampón Tris 50 mM, EDTA 0,5 mM o en agua exenta de ARNasa. Los péptidos VEPEP-9 se solubilizaron en agua y la solución de reserva de péptido se sometió a ultrasonidos durante 10 min en un baño de agua antes de la formación del complejo. Después se formaron los complejos VEPEP-9/ARNsi mediante la adición de ARNsi en la solución de péptido e incubando a 37°C durante 20-30 minutos para permitir que se formaran los complejos de péptido vehículo/ARNsi. Las partículas de NANOPEP-9 contienen una "envoltura del núcleo" de VEPEP-9/ARNsi, rodeada de un VEPEP-9 adicional con una relación molar de 1/20.

El diámetro del tumor se midió en dos direcciones a intervalos regulares utilizando un calibrador digital y el volumen del tumor se calculó como longitud x anchura x altura x 0,52. Las curvas muestran el valor medio del tamaño del tumor en una cohorte de seis animales y no se observó ni muerte de los animales ni ningún signo de toxicidad. Los experimentos se realizaron 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 la prueba t de Student y $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Las soluciones de reserva de partículas se realizaron en agua y eran estables durante al menos tres semanas a 4°C. Las partículas se pueden liofilizar para un almacenamiento a largo plazo; en ese caso, se añade de 5 a 20% de glucosa a la solución de partículas antes de la liofilización para estabilizar las partículas durante el procedimiento. Antes de la administración, las partículas se diluyeron en condiciones fisiológicas en presencia de NaCl al 0,9% y manitol del 5 al 20%.

Administración de ARNsi de Ciclina B1 con NANOPEP-9 después de una inyección tópica

El potencial de NANOPEP-9b o NANOPEP-9e para administrar ARNsi de ciclina B1 *in vivo* se evaluó en ratones xenoinjertados con PC3, A549, o SCK-3-HEK2 (Fig. 13). El efecto de una administración intratumoral local de partículas de NANOPEP-9/ARNsi se evaluó (relación molar de 20/1) sobre el crecimiento de tumores subcutáneos establecidos. El día 50, los tamaños tumorales en la cohorte de control, inyectada con PBS aumentaron aproximadamente 3 a 5 veces. Las reducciones del crecimiento tumoral en un 80% (PC3 y A549) y en un 65% (SCK-3-HEK2), se observaron usando 1 μ g de ARNsi de ciclina B1 en NANOPEP-9/ARNsi y en todos los casos, el crecimiento del tumor estaba completamente inhibido con 5 μ g (0,25 mg/kg) de ARNsi de ciclina B1 en NANOPEP-9/ARNsi (Figura 13). El día 48, se validó que la inhibición mediada por ARNsi de Cyc-B1 del crecimiento tumoral estaba asociada directamente con una disminución del nivel de ARNm de ciclina B1. Como control, la administración de 100 μ g (por vía intratumoral o intravenosa) de ARNsi desnudo o solamente vehículo NANOPEP-9 no tenía ningún efecto significativo sobre el crecimiento tumoral. Además, la inhibición del crecimiento del tumor era específica de la secuencia de ARNsi ya que un ARNsi de ciclina B1 que alberga dos mutaciones (Cyc-B3) que formaba un complejo con NANOPEP-9e y que se inyectó en los ratones a 0,5 mg/kg, era incapaz de inhibir el crecimiento tumoral.

Administración de ARNsi de Ciclina B1 con NANOPEP-9 después de una inyección sistémica

Se emplearon partículas de NANOPEP-9b y NANOPEP-9e para la administración intravenosa sistémica. Cinco microgramos (0,25 mg/kg) y 10 μ g (0,5 mg/kg) de ARNsi de Cyc B1 en partículas de NANOPEP-9b y NANOPEP-9e se inyectaron por vía intravenosa cada tres días en ratones portadores de tumores xenoinjertados. Se observó una reducción significativa en el tamaño del tumor PC3 el día 50, con 65% y 90% de inhibición con 5 μ g y 10 μ g de ARNsi, respectivamente (Figura 13). Se observó una reducción significativa en el tamaño del tumor HT29 el día 50, con 35% y 70% de inhibición con 5 μ g y 10 μ g de ARNsi, respectivamente (Figura xx). Estos resultados junto con la falta de actividad antitumoral de NANOPEP-9/ARNsi desordenado (10 μ g) o de vehículo NANOPEP-9 solo, ponen de relieve la fortaleza y la especificidad de la respuesta biológica asociada con la administración sistémica del ARNsi de ciclina B1

Ejemplo 5.3: Administración de PNA antisentido para ciclina B1 mediada con NANOPEP-9 después de una inyección sistémica

NANOPEP-9a y NANOPEP-9e se utilizaron para la administración de PNA antisentido dirigido a ciclina B1 antisentido *in vivo*. Se evaluaron las partículas de NANOPEP-9a/PNA, NANOPEP-9c/PNA y NANOPEP-9a/PNA recubiertas con PEG-VEPEP-9a, directamente en la potencia para inhibir el crecimiento tumoral. Las partículas se utilizaron para la administración intravenosa sistémica en un modelo de ratón con tumor xenoinjertado con SKB3-HEK2. La capa superficial de las partículas NANOPEP-9a estaba funcionalizada con un resto PEG en el extremo N-terminal de VEPEP-9a (PEG-VEPEP-9a), a través de la activación del grupo amino beta-alanina N-terminal. Las partículas de NANOPEP-9a pegilado/PNA se obtuvieron por etapas mediante la formación de complejos con moléculas de VE-

PEP-9a con PNA en una relación molar de 10/1, seguido por el recubrimiento de las partículas con una segunda capa de PEG-VEPEP-9a en una relación de 1/10. Se inyectaron por vía intravenosa 10 µg de PNA que formaba un complejo con NANOPEP-9a, NANOPEP-9e y PEG-NANOPEP-9a en una relación de 1/30, cada tres días en ratones portadores de tumor xenoinjertado con SKB3-HEK2. Como se muestra en la Figura 14, el día 50, las reducciones del crecimiento tumoral en un 35 y 42% se obtuvieron con 10 µg de PNA que formaba un complejo con NANOPEP-9a y NANOPEP-9e, respectivamente. Se observó una reducción significativa en el tamaño del tumor de un 78% con 10 µg de PNA que formaba un complejo con PEG-NANOPEP-9a, el día 50 (Figura 14). La inhibición del crecimiento del tumor era específica de la secuencia de PNA de ciclina B1 ya que 50 µg de PNA desordenado que formaba un complejo con NANOPEP-9a e inyectado en ratones, era incapaz de inhibir el crecimiento tumoral. Estos resultados muestran que VEPEP-9a y VEPEP-9e constituyen grandes vehículos para la administración de PNA *in vivo* y que PEG aumenta la biodistribución de PNA en el tumor mediante una mejora de la estabilidad de la partícula NANOPEP-9.

Ejemplo 5.4: Administración de doxomicina *in vivo* mediada con NANOPEP-9 después de una inyección sistémica

Se han empleado péptidos NANOPEP-9 (variantes VEPEP-9a, b, d, f) para la administración de doxorubicina *in vivo*. El potencial de NANOPEP-9 para administrar doxorubicina *in vivo* se evaluó en ratones xenoinjertados con SKB3-HEK2. La doxorubicina formaba un complejo con péptido VEPEP-9 con una relación molar de 1/20 con NANOPEP-9a, NANOPEP-9f y NANOPEP-9a-PEG. El tratamiento se inició 10 días después de la inoculación del tumor y con dosis de 2 mg/kg y 10 mg/kg de fármaco y se inyectaron cada 4 días mediante administración intravenosa sistémica y en los ratones se controló la supervivencia (Figura 15). Los resultados demuestran una tasa de supervivencia de 10 días en ausencia de fármaco, de 16 días con Doxo libre (20 mg/kg), de 32 y 45 días con 10 mg/kg formando un complejo con NANOPEP-9a o NANOPEP-f, respectivamente. Cuando las partículas están recubiertas con PEG-NANOPEP-9a, más del 45% de los ratones todavía estaban vivos después de 50 días, lo que sugiere que la PEGilación mejora drásticamente la biodisponibilidad de las partículas.

Ejemplo 5.5: Administración *in vivo* mediada con NANOPEP-9 de la carga a través de diferentes vías de administración

Las partículas a base de NANOPEP-9 han sido evaluadas utilizando diferentes vías de administración, incluyendo la administración intravenosa sistémica, intrarrectal, intranasal y transdérmica.

El péptido marcado con fluorescencia o ARNsi con Alexa 700, formaba un complejo en partículas de NANOPEP-9a o NANOPEP-9b. La biodistribución del péptido marcado con fluorescencia o del ARNsi se evaluó *in vivo* en ratones Balb6, 5 h después de una sola administración de 10 µg de péptido o ARNsi en partículas de NANOPEP-9. Las administraciones intravenosas e intrarrectales del complejo NANOPEP-9/péptido o NANOPEP-9/ARNsi permitían la administración de las cargas en la mayoría de los tejidos analizados, con una administración significativa en el pulmón y el músculo (Figura 16). La administración intranasal e intratraqueal permitía la administración de péptido y ARNsi principalmente en el cerebro, pulmón, hígado, páncreas y riñón. Finalmente, la administración transdérmica se limita a la administración del péptido y del ARNsi en y a través de la piel y los músculos, y parcialmente en el hígado, pero no en los otros tejidos (Figura 16).

Referencias

- [1] DJ. Glover, HJ. Lipps, DA. Jans, Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat. Rev. Genet.* 6 (2005) 299-310.
- [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: (Compilador: 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.
- [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: tools 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.
- [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 bio-

chemical applications, *Pept Res.* 1992 Jul-Aug;5(4):233-40.

[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.

5 [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.

[12] Verdine, G.L. y Hilinski, G.J. (2012), Stapled peptides for intracellular drug targets. *Methods in Enzymology*, vol 503, p3-33.

10

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
 DIVITA, Gilles
 5 DESHAYES , Sébastien
 KONATE, Karidia
 MORRIS , May Catherine
- <120> PÉPTIDOS QUE PENETRAN EN LAS CÉLULAS PARA LA ADMINISTRACIÓN INTRACELULAR DE MO-
 10 LÉCULAS
- <130> VMAahF644/356WO1
- <160> 54
- 15 <170> Patent In versión 3.5
- <210> 1
 <211> 20
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
- <220>
 <223> VEPEP9a1
- 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = beta-A o S
- 30 <400> 1
 Xaa Leu Arg Trp Trp Leu Arg Trp Ala Ser Arg Trp Phe Ser Arg Trp
 1 5 10 15
- Ala Trp Trp Arg
 20
- <210> 2
 35 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
- <220>
 40 <223> VEPEP9a2
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 45 <223> X = beta-A o S
- <400> 2
 Xaa Leu Arg Trp Trp Leu Arg Trp Ala Ser Arg Trp Ala Ser Arg Trp
 1 5 10 15
- Ala Trp Phe Arg
 20
- 50 <210> 3
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 55 <220>
 <223> VEPEP9b1

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = beta-A o S
 5
 <400> 3
 Xaa Arg Trp Trp Leu Arg Trp Ala Ser Arg Trp Ala Leu Ser Trp Arg
 1 5 10 15

 Trp Trp Arg

 <210> 4
 10 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 15 <223> VEPEP9b2

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

 <400> 4
 Xaa Arg Trp Trp Leu Arg Trp Ala Ser Arg Trp Phe Leu Ser Trp Arg
 1 5 10 15

 Trp Trp Arg

 25 <210> 5
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

 30 <220>
 <223> VEPEP9c1

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

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

 Trp Trp Arg

 40 <210> 6
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> VEPEP9c2

 <220>
 50 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = beta-A o S

 <400> 6

ES 2 687 987 T3

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

Trp Trp Arg

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

5

<220>
 <223> VEPEP9d

10

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

15

<400> 7
 Xaa Trp Trp Arg Trp Trp Ala Ser Trp Ala Arg Ser Trp Trp Arg
 1 5 10 15

20

<210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

25

<220>
 <223> VEPEP9e

30

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

35

<400> 8
 Xaa Trp Trp Gly Ser Trp Ala Thr Pro Arg Arg Arg Trp Trp Arg
 1 5 10 15

40

<210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

45

<220>
 <223> VEPEP9f

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

50

<400> 9
 Xaa Trp Trp Arg Trp Trp Ala Pro Trp Ala Arg Ser Trp Trp Arg
 1 5 10 15

55

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

<220>
 <223> VEPEP9

<220>

- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = beta-A o S
- 5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (2)..(2)
 <223> X = L o nada si X de la posición 3 es R, y X = nada si X de la posición 3 es nada
- 10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(3)
 <223> X = R o nada
- 15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (6)..(6)
 <223> X = L, R o G
- 20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (7)..(7)
 <223> X = R, W o S
- 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (10)..(10)
 <223> X = S, P o T
- 30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (11)..(11)
 <223> X = R si X de la posición 3 es R, y X = nada si X de la posición 3 es nada
- 35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (12)..(12)
 <223> X = W o P
- 40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (13)..(13)
 <223> X = F, A o R
- 45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (14)..(14)
 <223> X = S, L, R o P
- 50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (15)..(15)
 <223> X = R o S
- 55 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (16)..(16)
 <223> X = W si X de la posición 3 es R, y X = nada si X de la posición 3 es nada
- 60 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (17)..(17)
 <223> X = A o R si X de la posición 3 es R, y X = nada si X de la posición 3 es nada
- 65 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (19)..(19)
 <223> X = W o F

<400> 10
 Xaa Xaa Xaa Trp Trp Xaa Xaa Trp Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

5 Xaa Trp Xaa Arg
 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> PRT

10 <213> Artificial

<220>
 <223> VEPEP9

15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = beta-A o S

20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (2)..(2)
 <223> X = L o nada

25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (10)..(10)
 <223> X = S o P

30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (13)..(13)
 <223> X = F o A

35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (14)..(14)
 <223> X = S, L o P

40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (15)..(15)
 <223> X = R o S

45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (17)..(17)
 <223> X = A o R

50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (19)..(19)
 <223> X = W o F

55 <400> 11
 Xaa Xaa Arg Trp Trp Leu Arg Trp Ala Xaa Arg Trp Xaa Xaa Xaa Trp
 1 5 10 15

Xaa Trp Xaa Arg
 20

- <210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 5
- <220>
 <223> VEPEP9
- 10
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = beta-A o S
- 15
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (4)..(4)
 <223> X = R o G
- 20
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (5)..(5)
 <223> X = W o S
- 25
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (8)..(8)
 <223> X = S, T o P
- 30
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (9)..(9)
 <223> X = W o P
- 35
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (10)..(10)
 <223> X = A o R
- 40
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (12)..(12)
 <223> X = S o R
- 45
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (13)..(13)
 <223> X = beta-A o S
- 50
- <400> 12
 Xaa Trp Trp Xaa Xaa Trp Ala Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Trp Trp Arg
 1 5 10 15
- 55
- <210> 13
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial
- <220>
 <223> VEPEP-9-Funct-1
- 60
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = Colesterol, PEGilación, estearilo, palmitoílo, fragmentos FC o FAB pequeños, nanocuerpo, ácido nitrilo-triacético (2 x NTA), o péptidos dirigidos a tejidos.
- 65

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (13)..(13)
 <223> X = A o F
 5

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (19)..(19)
 <223> X = W o F
 10

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (21)..(21)
 <223> X = CH₂-CH₂-SH
 15

<400> 13
 Xaa Leu Arg Trp Trp Leu Arg Trp Ala Ser Arg Trp Xaa Ser Arg Trp
 1 5 10 15

Ala Trp Xaa Arg Xaa
 20

<210> 14
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20

<220>
 <223> VEPEP-9-Funct-2
 25

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

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (13)..(13)
 <223> X = A o F
 35

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (19)..(19)
 <223> X = W o F
 40

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (21)..(21)
 <223> X = CH₂-CH₂-S-S-Z, con Z = Colesterol, PEGilación, estearilo, palmitoílo, fragmentos FC o FAB pequeños,
 nanocuerpo, ácido nitrilotriacético (2 x NTA), o péptidos dirigidos a tejidos
 45

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

50
 Ala Trp Xaa Arg Xaa
 20

<210> 15
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55

<220>
 <223> VEPEP-9-Funct-3
 60

ES 2 687 987 T3

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = Colesterol, PEGilación, estearilo, palmitoilo, fragmentos FC o FAB pequeños, nanocuerpo, ácido nitrilo-
 5 triacético (2 x NTA), o péptidos dirigidos a tejidos
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (16)..(16)
 <223> X = CH2-CH2-SH
 10
 <400> 15
 Xaa Trp Trp Gly Ser Trp Ala Thr Pro Arg Arg Arg Trp Trp Arg Xaa
 1 5 10 15
 <210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> VEPEP-9-Funct-4
 20
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo
 25
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (16)..(16)
 <223> X = CH2-CH2-S-S-Z, con Z = Colesterol, PEGilación, estearilo, palmitoilo, fragmentos FC o FAB pequeños,
 30 nanocuerpo, ácido nitrilotriacético (2 x NTA), o péptidos dirigidos a tejidos
 <400> 16
 Xaa Trp Trp Gly Ser Trp Ala Thr Pro Arg Arg Arg Trp Trp Arg Xaa
 35 1 5 10 15
 <210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Cyc-B1 sentido
 45
 <400> 17
 ggcgaagauc aacauggcat t 21
 <210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Cyc-B1 antisentido
 55
 <400> 18
 ugccauguug aucuucgct t 21
 <210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 60
 <220>

<223> Cyc-B3 sentido
 <400> 19
 5 ggugaagauc agcauggcat t 21
 <210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Cyc-B3 antisentido
 <400> 20
 15 ugccaugucg aucuucacct t 21
 <210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> GAPDH sentido
 25 <400> 21
 caucaucccu gccucuacut t 21
 <210> 22
 <211> 19
 30 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> GAPDH antisentido
 35 <400> 22
 aguagaggca gggauaug 19
 <210> 23
 40 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> ODN1
 <400> 23
 agcttagctt 10
 50 <210> 24
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> Cyc-B1a
 <400> 24
 60 tgccatcggg cttggcy 17
 <210> 25
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> VEPEP-3a

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

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

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 15 <222> (18)..(18)
 <223> X = cisteamida

<400> 25
 Xaa Xaa Lys Trp Phe Glu Arg Trp Phe Arg Glu Trp Pro Arg Lys Arg
 1 5 10 15

Arg Xaa

20 <210> 26
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> VEPEP-3b

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

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

<220>
 40 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (18)..(18)
 <223> X = cisteamida

<400> 26
 Xaa Xaa Lys Trp Trp Glu Arg Trp Trp Arg Glu Trp Pro Arg Lys Arg
 1 5 10 15

45 Lys Xaa

<210> 27
 <211> 18
 <212> PRT
 50 <213> Artificial

<220>
 <223> VEPEP-3c

55 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo

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

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (18)..(18)
 10 <223> X = cisteamida

<400> 27
 Xaa Xaa Arg Trp Trp Glu Lys Trp Trp Thr Arg Trp Pro Arg Lys Arg
 1 5 10 15

15 **Lys Xaa**

<210> 28
 <211> 18
 <212> PRT
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> VEPEP-3d

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

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

35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (18)..(18)
 <223> X = cisteamida

40 <400> 28
 Xaa Xaa Arg Trp Tyr Glu Lys Trp Tyr Thr Glu Phe Pro Arg Arg Arg
 1 5 10 15

Arg Xaa

<210> 29
 <211> 19
 45 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> VEPEP-3e

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

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

60 <220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (19)..(19)

<223> X = cisteamida

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

Arg Arg Xaa

<210> 30

<211> 19

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> VEPEP-3f

15

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (1)..(1)

<223> X = un acetilo

20

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (2)..(2)

<223> X = beta-A o S

25

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (19)..(19)

<223> X = cisteamida

30

<400> 30

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

Arg Arg Xaa

<210> 31

35 <211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

40 <223> VEPEP-3g

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (1)..(1)

<223> X = un acetilo

45

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (2)..(2)

<223> X = beta-A o S

50

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (19)..(19)

<223> X = cisteamida

55

<400> 31

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

Phe Arg Xaa

5 <210> 32
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> VEPEP-3h

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

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

25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (19)..(19)
 <223> X = cisteamida

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

Arg Arg Xaa

30 <210> 33
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> VEPEP-6a

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

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

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

<400> 33
 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

<210> 34
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> VEPEP-6b
 <220>
 10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo
 <220>
 15 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (2)..(2)
 <223> X = beta-A o S
 <220>
 20 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (22)..(22)
 <223> X = cisteamida
 <400> 34
 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
 25
 <210> 35
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> VEPEP-6c
 <220>
 35 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo
 <220>
 40 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (2)..(2)
 <223> X = beta-A o S
 <220>
 45 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (22)..(22)
 <223> X = cisteamida
 <400> 35
 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
 <210> 36
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55

<220>
 <223> VEPEP-6d

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

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

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

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

20 Leu Trp Arg Lys Ala Xaa
 20

<210> 37
 <211> 22
 <212> PRT
 25 <213> Artificial

<220>
 <223> VEPEP-6e

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

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

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

45 <400> 37
 Xaa Xaa Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Ala Leu Trp Arg
 1 5 10 15

Leu Leu Trp Lys Ala Xaa
 20

<210> 38
 <211> 22
 50 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> VEPEP-6f

55 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

- <222> (1)..(1)
<223> X = un acetilo
- 5 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> X = beta-A o S
- 10 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 15 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (22)..(22)
<223> X = cisteamida
- 20 <400> 38
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
- 25 <210> 39
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial
- 30 <220>
<223> VEPEP-3bstapl
- 35 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> X = un acetilo
- 40 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> X = beta-A o S
- 45 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (4)..(4)
<223> X = R, que está unido al resto R de la posición 11 por un enlace hidrocarbonado
- 50 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (11)..(11)
<223> X = R, que está unido al resto R de la posición 4 por un enlace hidrocarbonado
- 55 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (19)..(19)
<223> X = cisteamida
- <400> 39
Xaa Xaa Lys Xaa Trp Trp Glu Arg Trp Trp Xaa Ser Trp Pro Arg Lys
1 5 10 15
Arg Lys Xaa
- 60 <210> 40

- <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 5 <220>
 <223> VEPEP-3estapl
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 10 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 15 <222> (2)..(2)
 <223> X = beta-A o S
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 20 <222> (6)..(6)
 <223> X = R, que está unido al resto S de la posición 13 por un enlace hidrocarbonado
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 25 <222> (13)..(13)
 <223> X = S, que está unido al resto R de la posición 6 por un enlace hidrocarbonado
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 30 <222> (19)..(19)
 <223> X = cisteamida
- <400> 40
 Xaa Xaa Arg Trp Trp Xaa Leu Trp Trp Arg Ser Trp Xaa Arg Leu Trp
 1 5 10 15
- Arg Arg Xaa
- 35 <210> 41
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 40 <220>
 <223> ST-VEPEP-6a
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 45 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 50 <222> (2)..(2)
 <223> X = beta-A o S
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 55 <222> (9)..(9)
 <223> X = R, que está unido al resto S de la posición 13 por un enlace hidrocarbonado
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 60 <222> (13)..(13)
 <223> X = S, que está unido al resto R de la posición 9 por un enlace hidrocarbonado

- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (21)..(21)
 5 <223> X = cisteamida
- <400> 41
 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
- 10 <210> 42
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 15 <220>
 <223> ST-VEPEP-6aa
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 20 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 25 <222> (2)..(2)
 <223> X = beta-A o S
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 30 <222> (9)..(9)
 <223> X = R, que está unido al resto S de la posición 13 por un enlace hidrocarbonado
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 35 <222> (13)..(13)
 <223> X = S, que está unido al resto R de la posición 9 por un enlace hidrocarbonado
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 40 <222> (21)..(21)
 <223> X = cisteamida
- <400> 42
 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
- 45 <210> 43
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 50 <220>
 <223> ST-VEPEP-6ab
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 55 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo

- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (2)..(2)
 5 <223> X = beta-A o S
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (9)..(9)
 10 <223> X = S, que está unido al resto S de la posición 13 por un enlace hidrocarbonado
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (13)..(13)
 15 <223> X = S, que está unido al resto S de la posición 9 por un enlace hidrocarbonado
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (21)..(21)
 20 <223> X = cisteamida
- <400> 43
 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
- 25 <210> 44
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 30 <220>
 <223> ST-VEPEP-6ad
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 35 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 40 <222> (2)..(2)
 <223> X = beta-A o S
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 45 <222> (9)..(9)
 <223> X = S, que está unido al resto S de la posición 13 por un enlace hidrocarbonado
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 50 <222> (13)..(13)
 <223> X = S, que está unido al resto S de la posición 9 por un enlace hidrocarbonado
- <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 55 <222> (21)..(21)
 <223> X = cisteamida
- <400> 44

ES 2 687 987 T3

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

- <210> 45
- <211> 21
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> ST-VEPEP-6b
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (1)..(1)
- 15 <223> X = un acetilo
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (2)..(2)
- 20 <223> X = beta-A o S
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (12)..(12)
- 25 <223> X = R, que está unido al resto S de la posición 16 por un enlace hidrocarbonado
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (16)..(16)
- 30 <223> X = S, que está unido al resto R de la posición 12 por un enlace hidrocarbonado
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (21)..(21)
- 35 <223> X = cisteamida
- <400> 45

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

- 40 <210> 46
- <211> 21
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 45 <223> ST-VEPEP-6ba
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (1)..(1)
- 50 <223> X = un acetilo
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (2)..(2)
- 55 <223> X = beta-A o S
- <220>

- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (12)..(12)
 <223> X = R, que está unido al resto S de la posición 16 por un enlace hidrocarbonado
- 5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (16)..(16)
 <223> X = S, que está unido al resto R de la posición 12 por un enlace hidrocarbonado
- 10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (21)..(21)
 <223> X = cisteamida
- 15 <400> 46
 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> 47
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial
- <220>
 <223> ST-VEPEP-6bb
- 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> X = un acetilo
- 30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (2)..(2)
 <223> X = beta-A o S
- 35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (12)..(12)
 <223> X = S, que está unido al resto S de la posición 16 por un enlace hidrocarbonado
- 40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (16)..(16)
 <223> X = S, que está unido al resto S de la posición 12 por un enlace hidrocarbonado
- 45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (21)..(21)
 <223> X = cisteamida
- 50 <400> 47
 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
- <210> 48
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

- <220>
<223> ST-VEPEP-6bd
- 5 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> X = un acetilo
- 10 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> X = beta-A o S
- 15 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (12)..(12)
<223> X = S, que está unido al resto S de la posición 16 por un enlace hidrocarbonado
- 20 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (16)..(16)
<223> X = S, que está unido al resto S de la posición 12 por un enlace hidrocarbonado
- 25 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (21)..(21)
<223> X = cisteamida
- 30 <400> 48
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> 49
<211> 21
- 35 <212> PRT
<213> Artificial
- <220>
<223> ST-VEPEP-6c
- 40 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> X = un acetilo
- 45 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> X = beta-A o S
- 50 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (6)..(6)
<223> X = R, que está unido al resto S de la posición 13 por un enlace hidrocarbonado
- 55 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (13)..(13)
<223> X = S, que está unido al resto R de la posición 6 por un enlace hidrocarbonado
- 60 <220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (21)..(21)

<223> X = cisteamida

5 <400> 49
 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

<210> 50

<211> 12

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> C4

15

<400> 50

Lys Lys Gln Val Arg Met Ala His Leu Val Leu Thr
 1 5 10

<210> 51

20 <211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> polipéptido

<400> 51

Gly Trp Ser Cys
 1

30 <210> 52

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> Polipéptido

<400> 52

Gly Trp Ala Ser Cys
 1 5

40

<210> 53

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

45

<220>

<223> C2S

<400> 53

50 Val Thr Leu Met Glu Ala Lys Lys Gln Val Leu Thr
 1 5 10

<210> 54

<211> 12

55 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> C2

<400> 54
Lys Lys Gln Val Leu Ala Met Glu His Leu Val Thr
1 5 10

5

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que penetra en las células, caracterizado por que comprende una secuencia de aminoácidos $X_1X_2X_3WWX_4X_5WAX_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}WX_{13}R$ (SEQ ID No: 10), en donde X_1 es beta-A o S, X_2 es L o nada, X_3 es R o nada, X_4 es L, R o G, X_5 es R, W o S, X_6 es S, P o T, X_7 es W o P, X_8 es F, A o R, X_9 es S, L, P o R, X_{10} es R o S, X_{11} es W o nada, X_{12} es A, R o nada y X_{13} es W o F, y en donde si X_3 es nada, entonces X_2 , X_{11} y X_{12} tampoco son nada.
2. El péptido que penetra en las células según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende una secuencia de aminoácidos $X_1X_2RWWRWAX_6RWX_8X_9X_{10}WX_{12}WX_{13}R$ (SEQ ID No: 11), en donde X_1 es beta-A o S, X_2 es L o nada, X_6 es S o P, X_8 es F o A, X_9 es S, L o P, X_{10} es R o S, X_{12} es A o R y X_{13} es W o F.
3. El péptido que penetra en las células según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la secuencia de aminoácidos se selecciona a partir del grupo que consiste en:
- $X_1LRWWRWASRWFSRWAWWR$ (SEQ ID No: 1),
- $X_1LRWWRWASRWASRWAWFR$ (SEQ ID No: 2),
- $X_1RWWRWASRWALSWRWWR$ (SEQ ID No: 3),
- $X_1RWWRWASRWFLSWRWWR$ (SEQ ID No: 4),
- $X_1RWWRWAPRWFPSRWWR$ (SEQ ID No: 5) y
- $X_1RWWRWASRWAPSWRWWR$ (SEQ ID No: 6).
4. El péptido que penetra en las células según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende una secuencia de aminoácidos $X_1WWX_4X_5WAX_6X_7X_8RX_{10}WWR$ (SEQ ID No: 12), en donde X_1 es beta-A o S, X_4 es R o G, X_5 es W o S, X_6 es S, T o P, X_7 es W o P, X_8 es A o R y X_{10} es S o R.
5. El péptido que penetra en las células según la reivindicación 1 o la reivindicación 4, en el que la secuencia de aminoácidos se selecciona a partir del grupo que consiste en:
- $X_1WWRWWASWARSWWR$ (SEQ ID No: 7),
- $X_1WWGSWATPRRRWWR$ (SEQ ID No: 8) y
- $X_1WWRWWAPWARSWWR$ (SEQ ID No: 9).
6. El péptido que penetra en las células según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además, unida covalentemente al extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos, una o varias entidades químicas seleccionadas a partir del grupo que consiste en un acetilo, un ácido graso, un colesterol, un polietilenglicol, una señal de localización nuclear, una señal de exportación nuclear, un anticuerpo, un polisacárido y una molécula dirigida a una diana.
7. El péptido que penetra en las células según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además, unido covalentemente al extremo C-terminal de dicha secuencia de aminoácidos, uno o varios grupos seleccionados a partir 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 sustituido opcionalmente, una amina primaria o secundaria, un derivado osídico, un lípido, un fosfolípido, un ácido graso, un colesterol, un polietilenglicol, una señal de localización nuclear, una señal de exportación nuclear, un anticuerpo, un polisacárido y una molécula dirigida a una diana.
8. Un complejo que comprende un péptido que penetra en las células según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y una carga seleccionada a partir del grupo que consiste en péptidos que incluyen dipéptidos y tripéptidos; proteínas; análogos de péptidos; oligonucleótidos que incluyen ARNs, una mezcla de ARNs seleccionados para silenciar un ARNm diana, miARNs, una mezcla de miARNs y oligodesoxinucleótidos; PNAs; y pequeñas moléculas hidrófobas que incluyen aminoácidos, duanomicina, paclitaxel, doxorubicina, AZT, porfirina, nucleósidos y nucleótidos marcados con fluorescencia, maghemita hidrófoba y colorantes fluorescentes.
9. El complejo según la reivindicación 8, en el que el tamaño del complejo está entre 50 nm y 300 nm.
10. Una nanopartícula que comprende un núcleo que comprende una carga que forma un complejo con una primera entidad seleccionada a partir del grupo que consiste en péptidos que penetran en las células, liposomas, estructuras policatiónicas y nanopartículas de carbono, en donde dicho núcleo está recubierto con un péptido que penetra en las células periférico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

- 5 11. La nanopartícula según la reivindicación 10, en donde dicha primera entidad es un péptido que penetra en las células seleccionado a partir del grupo que consiste en VEPEP-6a (SEQ ID No: 33), VEPEP-6b (SEQ ID No: 34), VEPEP-6c (SEQ ID No: 35), VEPEP-6d (SEQ ID No: 36), VEPEP-6e (SEQ ID No: 37), VEPEP-6f (SEQ ID No: 38), VEPEP-3a (SEQ ID No: 25), VEPEP-3b (SEQ ID No: 26), VEPEP-3c (SEQ ID No: 27), VEPEP-3d (SEQ ID No: 28), VEPEP-3e (SEQ ID No: 29), VEPEP-3f (SEQ ID No: 30), VEPEP-3g (SEQ ID No: 31), VEPEP-3h (SEQ ID No: 32), CADY, MPG, PEP-1, PPTG1, poli arginina y péptidos que penetran en las células según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
12. La nanopartícula según la reivindicación 10 o 11, en donde el tamaño de la nanopartícula está entre 20 nm y 300 nm.
- 10 13. El complejo según la reivindicación 8 o 9, o la nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde el péptido que penetra en las células y/o el péptido que penetra en las células periférico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, comprende un grupo polietilenglicol unido covalentemente a su extremo N-terminal, y/o un grupo cisteamida unido covalentemente a su extremo C-terminal.
- 15 14. El complejo según la reivindicación 8 o 9, o la nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde al menos parte de los péptidos que penetran en las células en el complejo o los péptidos que penetran en las células periféricos en la nanopartícula se unen a una molécula dirigida a una diana.
15. El complejo según la reivindicación 8 o 9, o la nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, para uso como un medicamento.
- 20 16. El complejo según la reivindicación 8 o 9, o la nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, para uso como un marcador o un agente de formación de imágenes.
17. Una composición terapéutica, cosmética o de diagnóstico que comprende un complejo según la reivindicación 8 o 9 o una nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12.
- 25 18. Un método para administrar una molécula en una célula *in vitro*, que comprende una etapa de poner en contacto dicha célula con el complejo según la reivindicación 8 o 9, o la nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde el complejo o la nanopartícula comprende dicha molécula.

FIG. 1

VEPEP9a1: (β A/S) LRWLRWASRWFSRWAWWR HHHHHHHHHHHHHHH	SEQ ID NO: 1
VEPEP9a2: (β A/S) LRWLRWASRWASRWAWFR HHHHHHHHHHHHHHH	SEQ ID NO: 2
VEPEP9b1: (β A/S) RWWRWASRWALSWRWWR	SEQ ID NO: 3
VEPEP9b2: (β A/S) RWWRWASRWFLSWRWWR HHHHHHHHHHHHHHH	SEQ ID NO: 4
VEPEP9c1: (β A/S) RWWRWAPRWFPWRRWWR HHHHH TTH	SEQ ID NO: 5
VEPEP9c2: (β A/S) RWWRWASRWAPWRRWWR HHHHHHHHH	SEQ ID NO: 6
VEPEP9d: (β A/S) WWRWWASWARSWWR HHHHHHHHHHH	SEQ ID NO: 7
VEPEP9e: (β A/S) WWGSWATPRRRWWR HHHHTT	SEQ ID NO: 8
VEPEP9f: (β A/S) WWRWWAPWARSWWR HHHHH THH	SEQ ID NO: 9

FIG. 2

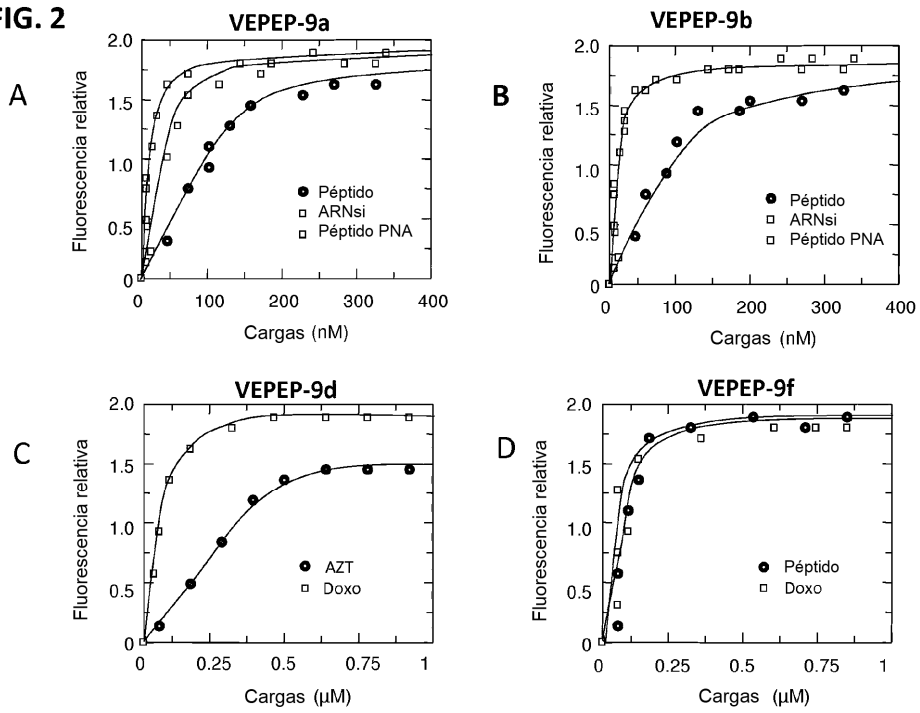


FIG. 3

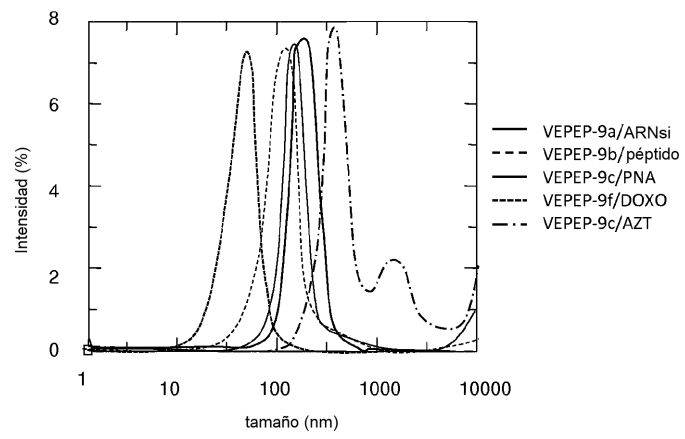


FIG. 4

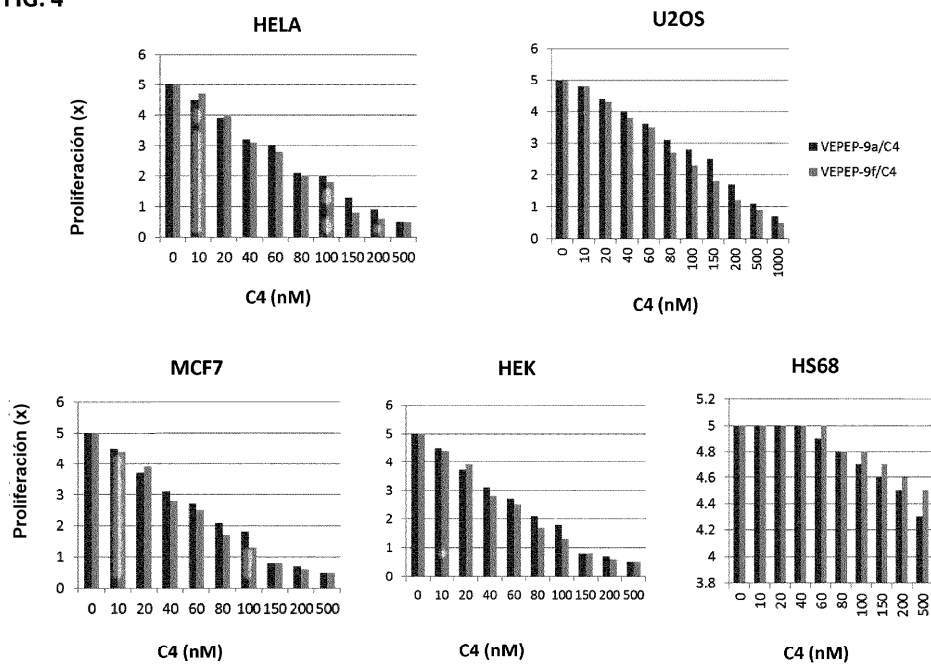


FIG. 5

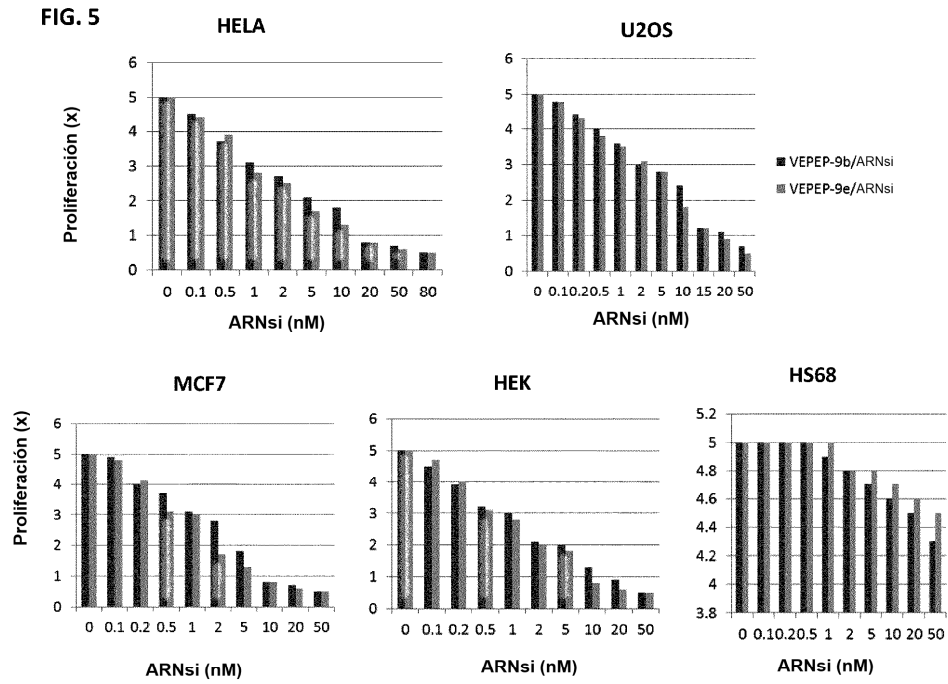


FIG. 6

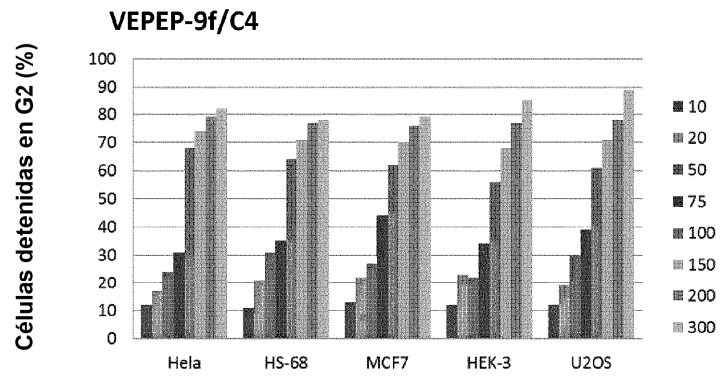
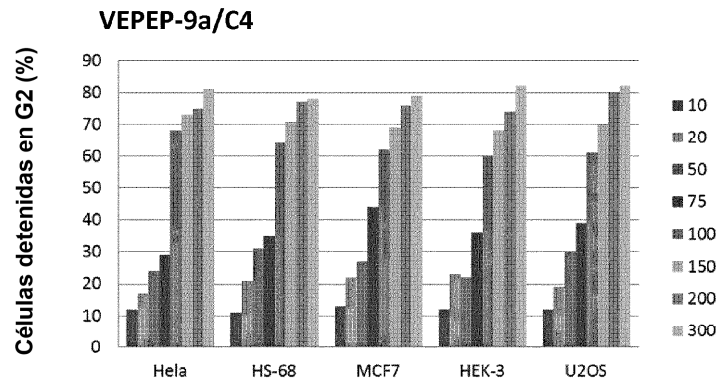


FIG. 7

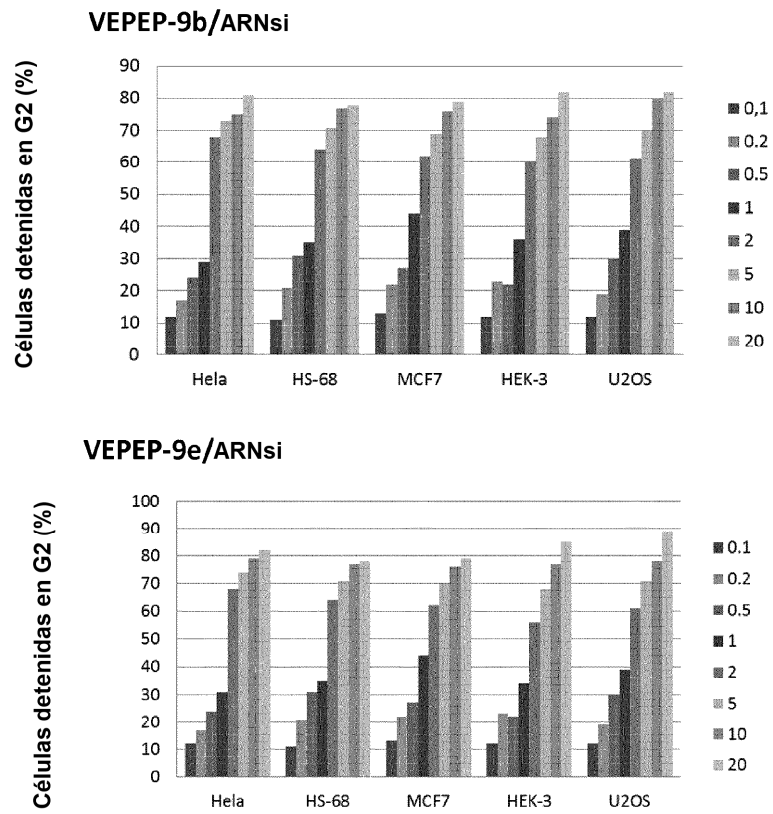


FIG. 8

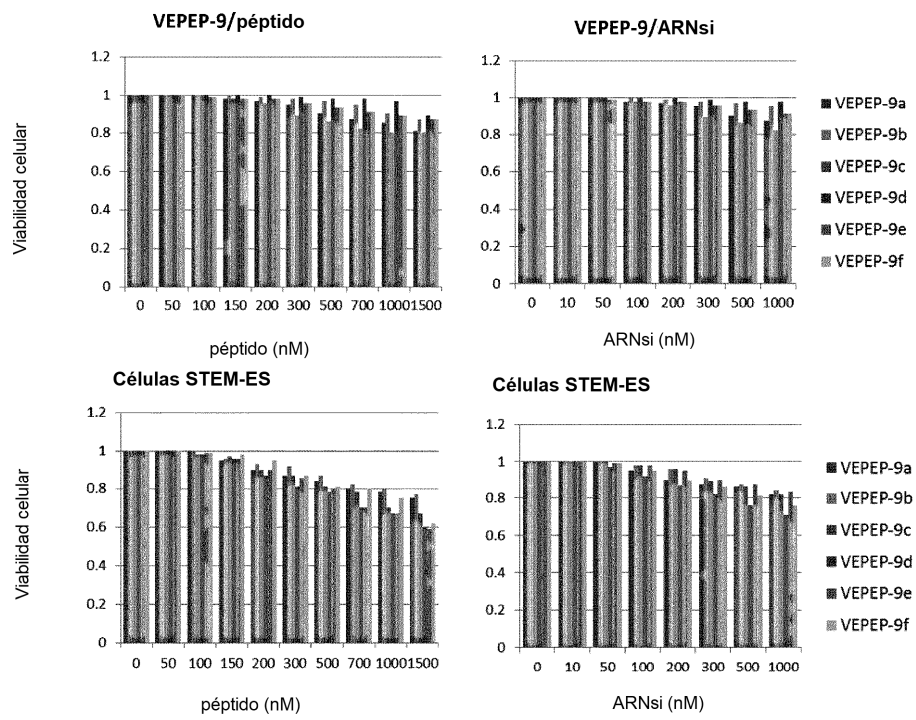


FIG. 9

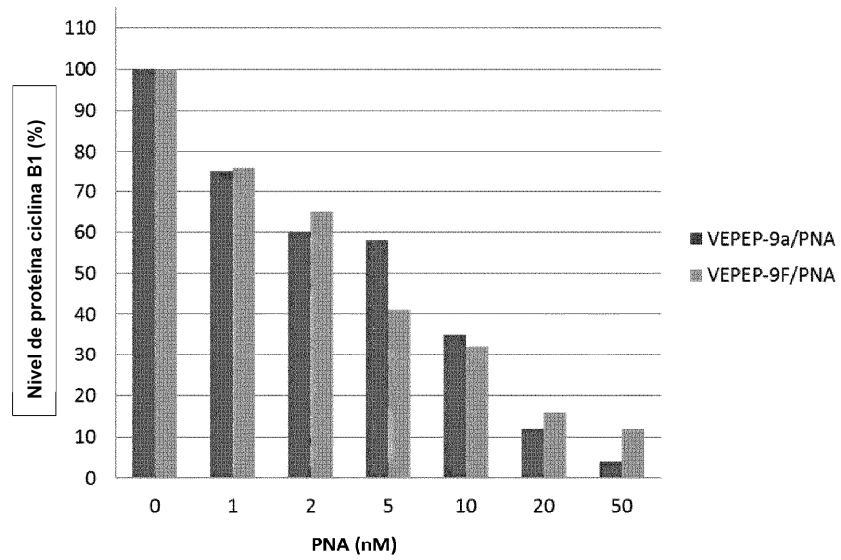


FIG. 10

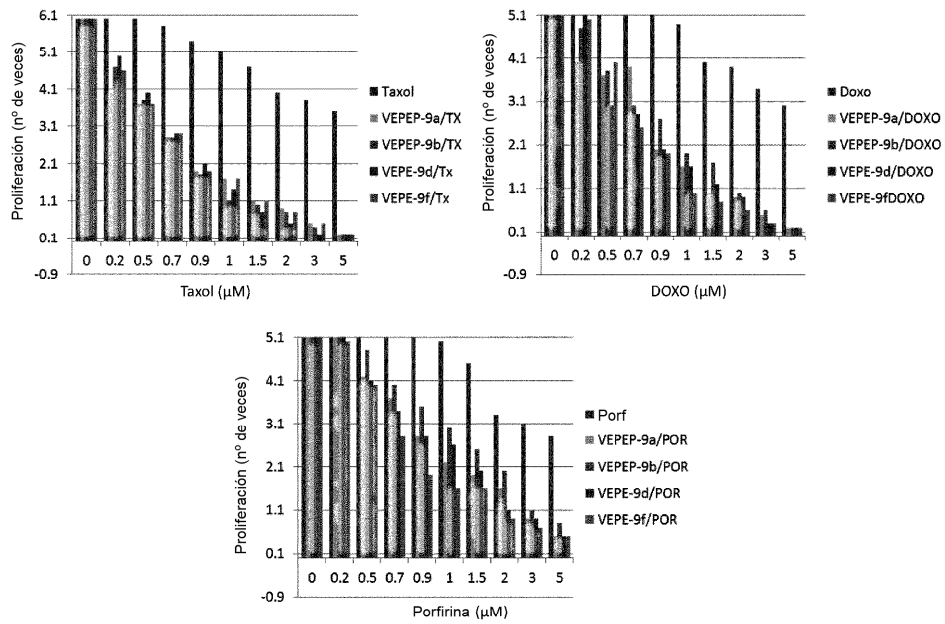


FIG. 11A

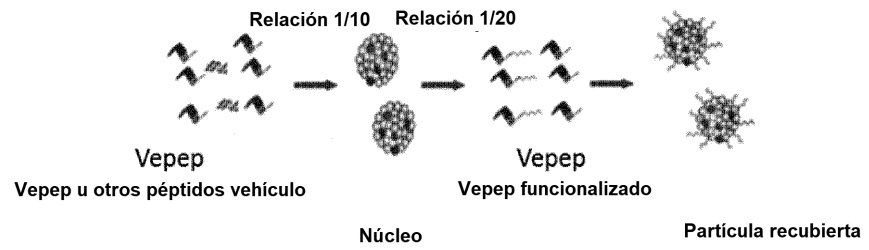


FIG. 11B

- Partícula del núcleo: Vepep o Péptido que penetra en las células
- Recubrimiento de superficie: Vepep funcionalizado con NTA
- Recubrimiento con anticuerpo específico que contiene marcador His

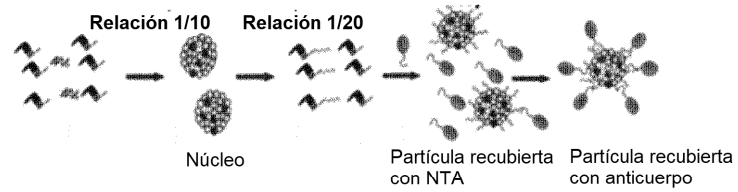


FIG. 12A

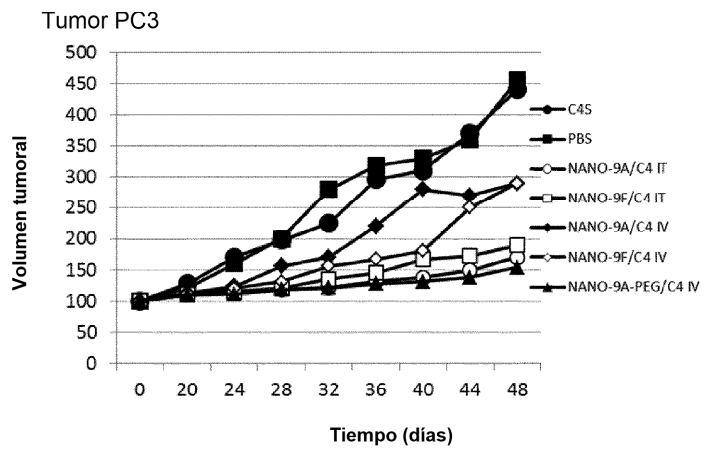


FIG. 12B

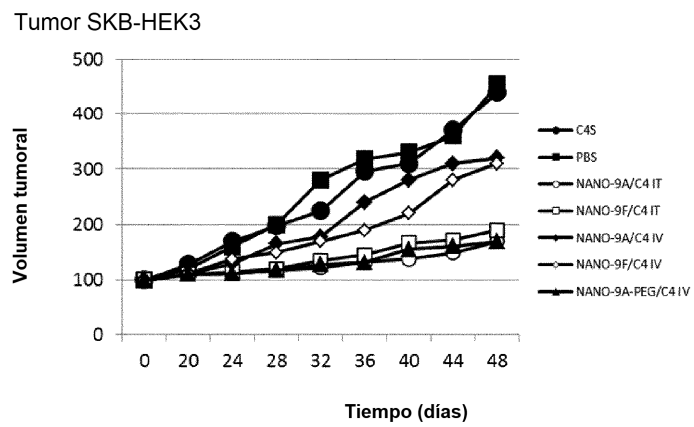


FIG. 13A

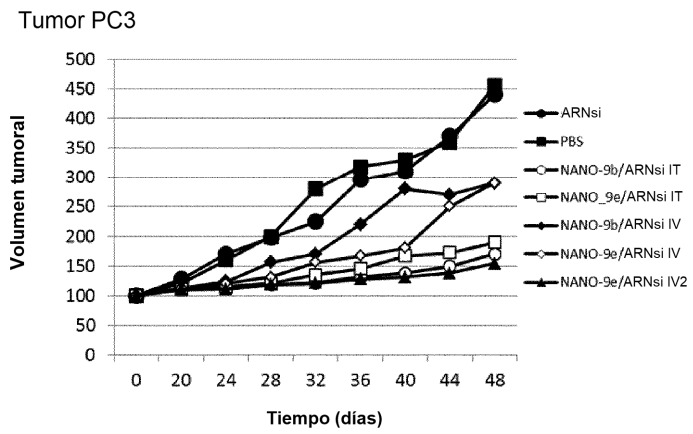


FIG. 13B

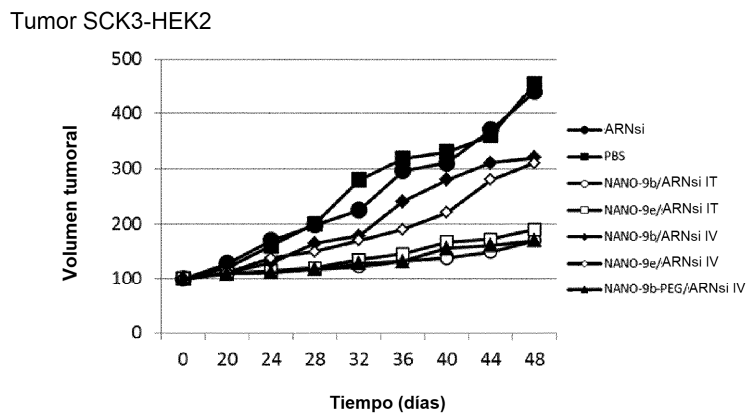


FIG. 14

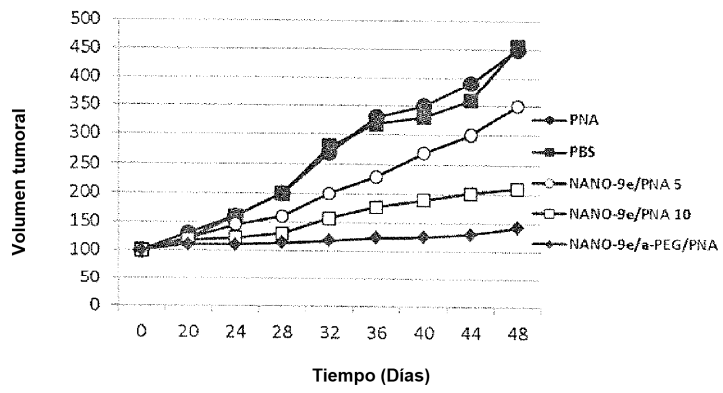
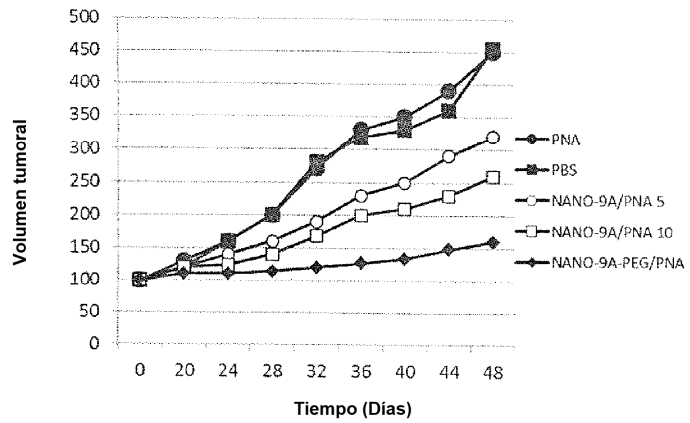


FIG. 15

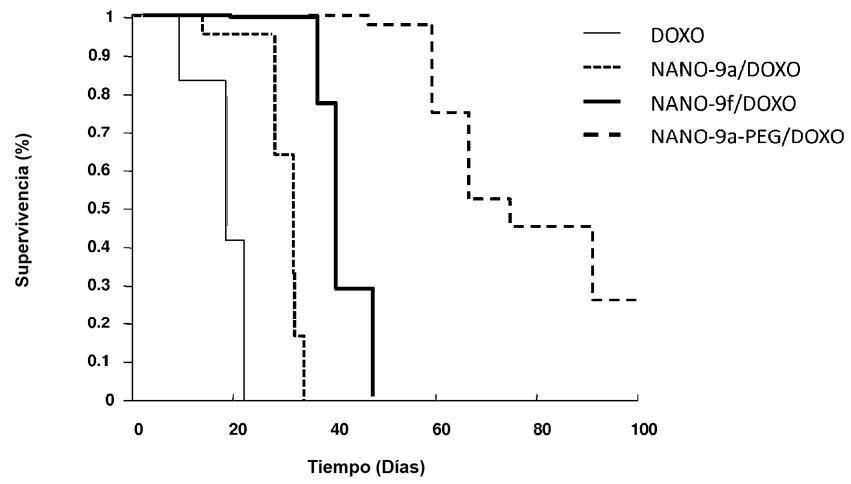


FIG. 16

