

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 518**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 47/42</b>	(2007.01)	<b>C12N 15/87</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/64</b>	(2007.01)		
<b>A61K 38/16</b>	(2006.01)		
<b>A61K 38/04</b>	(2006.01)		
<b>A61K 48/00</b>	(2006.01)		
<b>C07K 14/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 19/02</b>	(2006.01)		
<b>C12N 15/11</b>	(2006.01)		
<b>C12N 15/113</b>	(2010.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.01.2014 PCT/US2014/010212**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.07.2014 WO14107596**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.01.2014 E 14735277 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2941273**

54 Título: **Composiciones y procedimientos de transfección de polinucleótidos**

30 Prioridad:

**03.01.2013 US 201361748615 P**  
**23.08.2013 US 201361869634 P**  
**03.09.2013 US 201361873187 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.12.2018**

73 Titular/es:

**WASHINGTON UNIVERSITY (100.0%)**  
**One Brookings Drive**  
**St. Louis, MO 63130, US**

72 Inventor/es:

**WICKLINE, SAMUEL A. y**  
**HOU, KIRK**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 693 518 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

Composiciones y procedimientos de transfección de polinucleótidos

### Campo de la invención

5 La invención proporciona un complejo péptido-polinucleótido que comprende una relación seleccionada de péptido a polinucleótido, cuyo complejo se puede formular para una composición farmacéutica, y procedimientos para usarlo.

### Antecedentes de la invención

10 Se ha propuesto el ARN de interferencia (ARNi) con la utilización del ARN de interferencia pequeño (ARNip) como una terapia altamente eficaz para innumerables enfermedades que incluyen cáncer y enfermedades inflamatorias. Sin embargo, a pesar de casi dos décadas de intensa investigación, la terapéutica con ARNip ha demostrado un éxito limitado en la traducción a aplicaciones clínicas debido a la escasa absorción celular y la inestabilidad del ARNip libre en suero. Se han utilizado con éxito lípidos y polímeros catiónicos para la transfección de ARNip, pero pueden exhibir una citotoxicidad inaceptable y causar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés) y la fuga de  $Ca^{+2}$ . Además, los agentes de transfección de ARNip basados en péptido de penetración celular (CPP, de sus siglas en inglés), que se ha demostrado que reducen la citotoxicidad, no han logrado la alta eficacia de los agentes de transfección lipídica tradicionales debido a la captura lisosómica.

15 Por lo tanto, existe una necesidad en la materia de nuevas clases de composiciones de ARNip terapéuticas y agentes de transfección de ARNip capaces de una absorción celular eficaz y el suministro al citoplasma para tratar enfermedades. El documento de Hou K. y Wickline S. (2012), FASEB J., vol.26, relacionado con la Reunión de Biología Experimental; San Diego, CA, USA; 21-25 de abril, 2012, describe "un nuevo sistema de suministro de nanopartículas de péptidos procedentes de melitina para la muerte mediada por ARNip de STAT3 de células de melanoma B16".

### Sumario de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones.

25 La presente invención abarca una composición farmacéutica que comprende un complejo péptido-polinucleótido. El complejo péptido-polinucleótido comprende una relación molar de péptido:polinucleótido que es más de aproximadamente 50:1 y menos de aproximadamente 200:1. El péptido es (a) no citotóxico y capaz de afectar a la liberación de un polinucleótido desde un endosoma de una célula, y (b) comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. El polinucleótido es una secuencia de ARN o una secuencia de ADN. En un aspecto, el péptido comprende al menos una región catiónica y al menos un resto de histidina localizado adyacente a al menos una región catiónica del péptido. En otro aspecto, el polinucleótido es un ARN no codificante capaz de regular o inhibir la expresión de una secuencia de ácido nucleico.

30 La presente invención también abarca un procedimiento para suministrar un polinucleótido al citoplasma de una célula. El procedimiento comprende poner en contacto una célula con un complejo péptido-polinucleótido, comprendiendo el complejo péptido-polinucleótido una relación molar de péptido:polinucleótido que es más de aproximadamente 50:1 y menos de aproximadamente 200:1, en el que el péptido es (a) no citotóxico y capaz de afectar a la liberación de un polinucleótido desde un endosoma de una célula, y (b) comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En un aspecto, el péptido comprende al menos una región catiónica y al menos un resto de histidina localizado adyacente a o dentro de al menos una región catiónica del péptido. En otro aspecto, el polinucleótido es un ARN no codificante capaz de regular o inhibir la expresión de una secuencia de ácido nucleico.

35 La presente invención también abarca un procedimiento para suministrar un polinucleótido al citoplasma de una célula en un sujeto que lo necesita. El procedimiento comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un complejo péptido-polinucleótido, comprendiendo el complejo péptido-polinucleótido una relación molar de péptido:polinucleótido que es más de aproximadamente 50:1 y menos de aproximadamente 200:1, en el que el péptido es (a) no citotóxico y capaz de afectar a la liberación de un polinucleótido desde un endosoma de una célula, y (b) comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En un aspecto, el péptido comprende al menos una región catiónica y al menos un resto de histidina localizado adyacente a o dentro de al menos una región catiónica del péptido. En otro aspecto, el polinucleótido es un ARN no codificante capaz de regular o inhibir la expresión de una secuencia de ácido nucleico.

Otros aspectos de la invención se describen más a fondo a continuación.

### REFERENCIA A LAS FIGURAS DE COLOR

El archivo de la aplicación contiene al menos una fotografía ejecutada en color.

**Breve descripción de las figuras**

La **FIG. 1** representa dos gráficas que muestran **(A)** la optimización de las relaciones p5RHH/ARNip revela una mayor eficacia de transfección con cantidades aumentadas de p5RHH hasta un máximo de 150:1 p5RHH:ARNip, y **(B)** ensayos de Alamar blue indican que no hay citotoxicidad en las relaciones p5RHH:ARNip hasta 200:1 cuando se transfecta ARNip 50 nM.

La **FIG. 2** representa un gel de electroforesis y una micrografía MEB que muestra **(A)** un ensayo de retardo de gel que muestra que se requiere una relación p5RHH:ARNip de 50:1 para formar completamente ARNip, y **(B)** el análisis MEB de tamaño de partícula confirma los datos dinámicos de dispersión de luz revelando pequeños complejos de 100-200 nm de diámetro. (Barra de escala 100 nm)

La **FIG. 3** representa gráficas e imágenes de transferencia de Western **(A)** la respuesta a la dosis por citometría de flujo muestra que la transfección mediada por p5RHH es menos eficaz que por Lipofectamine2000, pero también muestra una alta eficacia de transfección de ARNip con una atenuación visible a concentraciones tan bajas como 5 nM. **(B)** Los ensayos con Alamar blue indican que p5RHH muestra una toxicidad mínima a concentraciones de ARNip de hasta 200 nM. El análisis de transferencia Western **(C)** y RT-PCR **(D)** del ARNm de GFP confirma la capacidad de p5RHH para disminuir los niveles de ARNm de una manera específica de secuencia con una CI50 de ~ 50 nM. Lipofectamine 2000 tiene una eficacia de transfección más alta con una CI50 de entre 10-25 nM determinada por transferencia de western **(E)** y RT-PCR **(F)**.

La **FIG. 4** representa **(A)** El derivado de melitina no funcional, p5RWR, no exhibe capacidad de transfección de ARNip cuando se criba para la atenuación de GFP en células B16GFP mediante citometría de flujo. El ARNip se suministra, pero no alcanza el citoplasma hasta que se incubaba con cloroquina 50 µM. **(B, C)** La microscopia confocal confirma los datos de la citometría de flujo, lo que indica que p5RWR no manifiesta una liberación apreciable de oligonucleótidos en el citoplasma a menos que se incubaba con cloroquina 50 µM. **(D, E)** En comparación, p5RHH muestra una liberación eficaz de oligo en el citoplasma similar al suministro de oligonucleótidos a través de Lipofectamine 2000.

La **FIG. 5** representa que los datos de transferencia Western indican que p5RHH **(A)** es aproximadamente 5 veces menos eficaz que Lipofectamine 2000 **(B)** al iniciar una disminución en los niveles de la proteína STAT3 en células B16. Los datos de RT-PCR muestran que p5RHH **(C)** pierde actividad a concentraciones por debajo de 50 nM mientras que Lipofectamine 2000 **(D)** exhibe actividad a dosis tan bajas como 10 nM. El análisis de viabilidad de B16 a través de Alamar Blue demuestra que la transfección de p5RHH **(E)** conduce a una disminución de la viabilidad de B16 mediante el silenciamiento de la expresión de oncogenes de una manera específica de secuencia, mientras que Lipofectamine2000 **(F)** causa citotoxicidad dependiente de dosis inespecífica.

La **FIG. 6** representa la cuantificación de los niveles de proteína STAT3 en células B16 cuando se suministra ARNip aleatorio o específico de STAT3 mediante p5RHH **(A)** o Lipofectamine 2000 **(B)**. Los datos se presentan como el promedio de 3 experimentos independientes.

La **FIG. 7** representa **(A)** la transferencia de Western representa una disminución dependiente de la dosis en los niveles de proteína STAT3 en HUVEC tratadas con ARNip específico de STAT3. **(B)** Los datos de la RT-PCR ilustran una atenuación del 60 % dependiente de p5RHH en el ARNm de STAT3 a concentraciones tan altas como 200 nM. **(C)** p5RHH no tiene citotoxicidad hacia las células HUVEC cuando transfectan ARNip. **(D)** Las HUVEC tratadas con ARNip de STAT3 muestran disminución de una formación de tubo de 60 % en matrigel en comparación con los controles **(E, F)** como se cuantificó en **(G)**. Una disminución en la formación de tubo se acompaña de una disminución del 40 % en la migración de HUVEC en respuesta a bFGF en ensayos de migración transwell como se determina por microscopía **(H)** y ensayos Alamar Blue **(I)**.

La **FIG. 8** representa la cuantificación de los niveles de proteína STAT3 a partir de HUVEC transfectadas con p5RHH que demuestra una CI50 de ~ 50 nM. Media de 3 experimentos independientes.

La **FIG. 9** representa la transferencia de Western representativa **(A)** que muestra la atenuación de STAT3 utilizando Lipofectamine 2000 que muestra una CI50 menor que 10 nM con cuantificación **(B)**. La RT-PCR verifica una fuerte atenuación a 10 nM **(C)**. A pesar de la alta eficacia de suministro de ARNip, Lipofectamine 2000 causa una citotoxicidad extensa, con una disminución > 50 % en la viabilidad celular a solo ARNip 50 nM.

La **FIG. 10** representa la cuantificación de la transmigración de HUVEC en respuesta a un gradiente de bFGF mediante microscopía de fluorescencia que muestra que el ARNip de STAT3 disminuye la transmigración de HUVEC en > 50 % en comparación con las muestras tratadas con ARNip aleatorio.

La **FIG. 11** representa **(A)** el análisis de transferencia de Western ilustra la atenuación de JNK2 en células RAW264.7 mediante p5RHH con CI50 < 25 nM. **(B)** Cabe destacar que, p5RHH causa solo un ~ 5 % de disminución en la viabilidad celular cuando se transfecta el ARNip aleatorio a 100 nM. **(C-E)** La atenuación de JNK2 en ARNip 50nM muestra una fuerte disminución en la acumulación de gotitas de lípidos en células RAW264.7 cuando se incubaron con Ac-LDL 50 µg/ml durante la noche cuando se compara con células tratadas con ARNip aleatorio y controles no tratados.

La **FIG. 12** representa que Lipofectamine 2000 atenúa JNK2 en células RAW264.7 con una CI50 < 25 nM **(A)**, pero induce una citotoxicidad extensa a concentraciones tan bajas como 10 nM **(B)**.

La **FIG. 13** representa **(A)** La incubación de nanopartículas de p5RHH:ARNip con HSA 50 µg/ml durante 30 minutos o toda la noche se caracteriza por una atenuación de GFP mejorada cuando se compara con las nanopartículas de p5RHH:ARNip recién preparadas. **(B)** La microscopia confocal de células B16 transfectadas en medio de cultivo celular normal complementado con FBS al 10 % muestra una liberación de oligonucleótidos eficaz en el citoplasma.

La **FIG. 14** representa un esquema y una imagen de microscopía de fuerza atómica que muestra el ensamblaje de nanopartículas de p5RHH/ARNip. **(A)** Esquema para la formulación de nanopartículas de p5RHH/ARNip estabilizadas con albúmina. **(B)** Las imágenes de AFM en modo húmedo de nanopartículas de p5RHH/ARNip revelan un tamaño medio de partícula de  $\sim 55 \text{ nM} \pm 18$ .

La **FIG. 15** representa una gráfica y una micrografía electrónica que muestran las partículas de ARNip y la eficacia de transfección de las partículas. **(A)** La eficiencia de transfección de los complejos incubados durante la duración indicada, medida por el porcentaje de células que exhiben la atenuación de GFP a concentración final de ARNip de GFP 50 nM cuando se empaquetan con p5RHH. Estos datos indican que la incubación de p5RHH/ARNip de 40 minutos proporciona la duración óptima de incubación para una transfección máxima. **(B)** Las partículas incubadas durante el tiempo indicado muestran que las partículas de p5RHH/ARNip tienen un tamaño de  $< 100 \text{ nm}$ .

La **FIG. 16** representa gráficas que muestran que la absorción de nanopartículas de p5RHH/Alexa488-ARNip a  $4^\circ \text{C}$  **(C)** se reduce drásticamente en comparación con la absorción a  $37^\circ \text{C}$  **(B)**. Las células no tratadas se muestran para comparación **(A)**.

La **FIG. 17** representa gráficas e imágenes de microscopía que muestran absorción y colocalización de nanopartículas de p5RHH/ARNip. **(A-D)** La absorción de 40 minutos de nanopartículas de p5RHH/Alexa488-ARNip muestra que el 60 % de las células tratadas toman **(A)** nanopartículas de p5RHH/ARNip. La presencia de inhibidores de endocitosis indica que **(B)** filipina  $100 \mu\text{g/ml}$  (inhibidor de caveolae) y **(C)** PAO  $10 \mu\text{M}$  (inhibidor de endocitosis mediado por clatrina) no inhiben la absorción de nanopartículas de p5RHH/ARNip. Como alternativa, el tratamiento con inhibidor de macropinocitosis (EIPA,  $80 \mu\text{M}$ ) **(D)** casi anula la absorción de nanopartículas. **(E-J)** La colocalización según se determina mediante microscopía confocal muestra que las nanopartículas de p5RHH/Cy-3 ARNip se toman con FITC-dextrano de 70 kDa **(J)** pero no con FITC-transferrina **(I)**. Barra de escala  $10 \mu\text{m}$ .

La **FIG. 18** representa gráficas que muestran que los inhibidores de endocitosis solo inhiben la absorción de marcadores específicos para la ruta indicada.

La **FIG. 19** representa una imagen microscópica que muestra la liberación citoplásmica de Cy-3-ARNip en 1 hora.

La **FIG. 20** representa gráficas que muestran que **(A-C)** la bafilomicina A1 no inhibe la absorción de nanopartículas de p5RHH/Alexa488-ARNip **(C)** en comparación con la transfección en ausencia de bafilomicina A1 **(B)**. **(D-F)** Por otra parte, la bafilomicina A1 bloquea la atenuación de GFP **(F)** en comparación con la transfección en ausencia de bafilomicina A1 **(E)** lo que indica que la acidificación endosómica es crucial para la transfección de ARNip mediada por p5RHH.

La **FIG. 21** representa gráficas e imágenes de microscopía que muestran que **(A)** la fluorescencia de la unión de TOPRO3 a ARNip aumenta drásticamente a  $\text{pH} \leq 5,5$  cuando se empaqueta a través de p5RHH **(■)**, pero no el péptido no funcional p5RWR **(◆)**. **(B)** La electroforesis en gel de poliacrilamida confirma que p5RHH libera ARNip a  $\text{pH} 4,5$  pero p5RWR no muestra una liberación dependiente de pH. **(C)** p5RHH también se libera a pH bajo con un aumento en la liberación de p5RHH a  $\text{pH} \leq 5,5$ . **(D)** el p5RHH liberado es capaz de hemólisis, lo que lleva a un aumento de la liberación de hemoglobina a  $\text{pH} \leq 5,5$ . **(E-H)** Los ensayos de liberación de naranja acridina muestran que las nanopartículas de p5RHH/ARNip son capaces de alterar los endosomas **(H)** cuando se prueban en cultivo tisular, como se exhibe por la liberación de colorante similar a la cloroquina  $100 \mu\text{M}$  **(F)**, mientras que p5RWR no puede **(G)**. **(I-K)** Esquema que muestra el desensamblaje del complejo péptido-polinucleótido a diversos valores de pH. Barra de escala  $50 \mu\text{m}$ .

La **FIG. 22** representa dos gráficas que muestran que **(A)** la hemólisis normalizada muestra una disminución dependiente del pH en la capacidad del p5RHH libre para alterar el RBC. En cambio, las nanopartículas de p5RHH/ARNip muestran un aumento en la alteración de RBC con pH disminuido, recuperando la misma capacidad lítica de p5RHH libre a  $\text{pH} 5,5$ . Los resultados se informaron como hemólisis fraccional normalizada a la lisis máxima por p5RHH  $100 \mu\text{M}$  a  $\text{pH} 7,5$  registrada en experimentos separados. **(B)** La hemólisis de RBC normalizada a hemólisis máxima en Triton-X al 0,1 % indica que p5RHH lisa RBC con una  $\text{CI}_{50}$  entre  $200\text{-}400 \mu\text{M}$ .

La **FIG. 23** representa gráficas e imágenes de microscopía que muestran que **(A)** la atenuación de GFP en células B16 GFP revela que solo p5RHH puede suministrar con éxito ARNip de GFP al citoplasma, mientras que p5RWR no puede, incluso con escape endosomal inducido por cloroquina. **(B)** FACS revela que tanto p5RWR como p5RHH suministran cantidades similares de ARNip marcado con Alexa 488. Control no tratado (cuadrado rojo); a488 ARNip/p5RWR  $50 \text{ nM}$  (cuadrado beige); a88 ARNip/p5RWR  $50 \text{ nM}$  + cloroquina (cuadrado azul); a488 ARNip/p5RHH  $50 \text{ nM}$  (cuadrado verde); a88 ARNip/p5RHH  $50 \text{ nM}$  + cloroquina (cuadrado turquesa). La microscopía confocal (barra de escala  $10 \mu\text{m}$ ) revela que p5RWR **(C)** suministra ARNip mediante restos en vesículas puntiformes mientras que p5RHH logra distribución citoplásmica **(D)**. Se requiere la incubación simultánea con cloroquina para liberar ARNip al citoplasma cuando se transfecta con p5RWR **(E)** pero no tiene efecto sobre la transfección mediada por p5RHH **(F)**.

La **FIG. 24** representa transferencias de Western, un gráfico e imágenes de microscopía que muestran que **(A, B)** la transferencia Western demuestra una disminución dependiente de la dosis en la expresión de p100/p52 o p65 que no se observa cuando se tratan células F8 con ARNip aleatorio. **(C)** Los ensayos con Alamar blue 48 horas después de la transfección revelan que el ARNip aleatorio **(■)** no afecta la viabilidad de las células F8. La atenuación de la ruta de NF $\kappa$ B canónica con ARNip de p65 **(A)** tiene una  $\text{CI}_{50}$  de casi  $200 \text{ nM}$ . Dirigiéndose a la ruta de NF $\kappa$ B no canónica con ARNip de p100/p52 **(◆)** produce una  $\text{CI}_{50}$  de  $100 \text{ nM}$ . Sin embargo, el bloqueo simultáneo de las rutas de NF $\kappa$ B canónica y no canónica **(◆)** mejora la  $\text{CI}_{50}$  a  $50 \text{ nM}$ . Las imágenes de IVIS (barra

de escala de 5 mm) revelan la localización del tumor de ARNip marcado con Cy5.5 en el tumor de los ratones tratados (**E**), y se confirma mediante microscopía confocal (**G**) (barra de escala de 50  $\mu$ m). Los controles no tratados se muestran para comparación (**D**, **F**).

La **FIG. 25** representa imágenes de microscopía confocal que muestran que los tumores de ratones inyectados con nanopartículas de ARNip p5RHH/Cy5.5 exhiben acumulación de ARNip de Cy5.5 en la periferia, mientras que el ARNip de Cy5.5 limitado se encuentra en el centro del tumor. (Barra de escala 50  $\mu$ m).

La **FIG. 26** representa un esquema del suministro de ARNip en el citoplasma utilizando partículas de p5RHH/ARNip, que muestra la entrada en una célula y la liberación de ARNip de la partícula de péptido/ARNip y de endosoma en el citoplasma.

La **FIG. 27** representa imágenes IVIS de órganos y tumores de un animal a quien se le administró un control salino (**A**) y a un animal a quien se le administró p5RHH/ARNip con un ARNip de NF $\kappa$ B marcado con Cy5.5 (**B**).

La **FIG. 28** representa transferencias Northern y gráficas que muestran la citotoxicidad de p5RHH/ARNip (**A**, **C**) en comparación con Lipofectamine 2000 (**B**, **D**).

La **FIG. 29** representa un esquema del modelo murino inducido por anticuerpos de colágeno y la administración de ARNip.

La **FIG. 30** muestra gráficas y una imagen IVIS que muestra (**A**) el grosor del tobillo (**B**) y la puntuación artrítica de los animales a los que se administró solución salina, y los animales transfectados con p5RHH/ARNip con ARNip aleatorio o ARNip dirigido a la subunidad p65 de la ruta canónica. (**C**) Imagen IVIS de animales a los que se administró solución salina o p5RHH/ARNip con ARNip que se dirige a la subunidad p65 de la ruta canónica.

La **FIG. 31** representa una imagen que muestra la eficacia de la terapia de artritis que utiliza p5RHH/ARNip que se dirige a la subunidad p65 de la ruta canónica utilizando imágenes de entropía con ultrasonido.

La **FIG. 32** muestra imágenes y gráficas que muestran que la nanoterapia con p65-ARNip en artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA, de sus siglas en inglés) es eficaz. La artritis se indujo con inyección i.p. de 1,5 mg de cóctel de anticuerpos de 5 clones en el día 0 seguido de la inyección de 50  $\mu$ g de LPS en el día 3. En el día 4, cuando se estableció la artritis temprana, los ratones se dividieron aleatoriamente en 3 grupos para el tratamiento (Tx) con solución salina, nanopartículas de secuencia aleatoria y nanopartículas de p65-ARNip administradas i.v. en los días 4, 5 y 6. Las patas fueron fotografiadas el día 10 (**A-C**). El cambio en el grosor del tobillo (**D**), la puntuación de artritis (**E**) y el % de pérdida de peso (**F**) se registraron diariamente. Los valores se presentan como media  $\pm$  EEM, n = 6-8 ratones por grupo de tratamiento. \*P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001

La **FIG. 33** representa inmunotransferencias y gráficas que muestran que la nanoterapia con p65-ARNip suprime la expresión de p65 y la inflamación en CAIA. El día 10, se sacrificaron los ratones y se recogieron las patas, se homogeneizaron y los lisados aclarados se transfirieron para la expresión de p65 (**A**). Los lisados también se analizaron para citoquinas inflamatorias [TNF $\alpha$  (**B**), IL-1 $\beta$  (**C**), IL-6 (**D**), MCP-1 (**E**)] mediante matrices de perlas citométricas y ELISA. \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001

La **FIG. 34** representa gráficas que muestran parámetros hematológicos después de la administración de nanopartículas. El día 10, se sacrificaron los ratones y se obtuvo sangre para WBC y diferenciales. N = 6-8 ratones por grupo de tratamiento. (**A**) Hemoglobina; (**B**) HCT; (**C**) plaqueta; (**D**) WBC; y (**E**) WBC, neutrófilos segmentados y linfocitos.

La **FIG. 35** representa gráficas que muestran la función renal después de la administración de nanopartículas. El día 10, se sacrificaron los ratones y se obtuvo sangre para el análisis de electrolitos y función renal. (**A**) Sodio en suero; (**B**) cloruro en suero; (**C**) potasio en suero; (**D**) BUN; (**E**) creatinina.

La **FIG. 36** representa gráficas que muestran la función hepática después de la administración de nanopartículas. El día 10, se sacrificaron los ratones y se obtuvo sangre para la pruebas de función hepática. (**A**) AST; (**B**) ALT; (**C**) bilirrubina total.

La **FIG. 37** representa una gráfica que muestra la activación del complemento después de la administración de nanopartículas. Los ratones se inyectaron i.v. con el control indicado (HBSS) o nanopartículas y plasma recogidos a los 30 minutos para la generación de C3a, una indicación de la activación del complemento. Las nanopartículas de DOTAP PFOB al 50 % en moles, que se ha demostrado que tienen un complemento fuertemente activado in vivo, sirvieron como control positivo. No existe una diferencia estadística significativa entre HBSS y el grupo de nanopartículas p65-ARNip o aleatorias.

La **FIG. 38** representa los efectos fuera de la diana de las nanopartículas. Se recogió el bazo el día 10 y los esplenocitos se enumeraron y se representaron gráficamente en (**A**). Las subpoblaciones de esplenocitos se analizaron por citometría de flujo y se representan en (**B**).

La **FIG. 39** representa los efectos fuera de la diana de las nanopartículas. Se seleccionaron positivamente linfocitos T CD4+ de esplenocitos y se estimularon con anticuerpo monoclonal anti-CD3 unido a la placa (5  $\mu$ g/ml). A las 72 h, se analizó el sobrenadante del cultivo para determinar la secreción de citocinas mediante una matriz de perlas citométricas. (**A**) TNF- $\alpha$ ; (**B**) IFN-gamma; (**C**) IL-6; (**D**) IL-10.

La **FIG. 40** muestra gráficas que muestran la respuesta humoral a las nanopartículas de ARNip. El día 10 se sacrificaron los ratones y se recogió el suero. Se midieron los niveles totales de IgG (**A**) e IgM (**B**) mediante ELISA tipo sándwich.

La **FIG. 41** muestra gráficas que muestran la respuesta humoral a las nanopartículas. El día 10 se sacrificaron los ratones y se recogió el suero. Se evaluaron las respuestas específicas de IgM (**A**, **C**) e IgG (**B**, **D**) a las nanopartículas peptídicas (p5RHH, **A-B**) y las nanopartículas de ARNip (ARNip de p5RHH:p65, **C-D**) utilizando un ensayo ELISA de tipo sándwich modificado.

La **FIG. 42** representa la absorción de nanopartículas fuera de la diana en células de sangre periférica. Se inyectaron los ratones con HBSS (**B**, **D**) o nanopartículas que contenían la secuencia aleatoria marcada con Cy3

(A, C). Después de 30 minutos, se sacrificaron los ratones y se obtuvieron células blancas de sangre periférica y se analizaron para determinar las nanopartículas asociadas a células (células Cy3+) mediante citometría de flujo. Las células se tiñeron conjuntamente con Ly6G (neutrófilos; A-B) y Ly6C (monocitos; C-D).

- 5 La FIG. 43 representa la absorción de nanopartículas fuera de la diana en esplenocitos. Se inyectaron los ratones con HBSS (B, D) o nanopartículas que contenían la secuencia aleatoria marcada con Cy3 (A, C). Después de 30 minutos, se sacrificaron los ratones y se obtuvieron esplenocitos y se analizaron para determinar las nanopartículas asociadas a células (células Cy3+; y-axis) mediante citometría de flujo. Las células se tiñeron conjuntamente con Ly6G (neutrófilos; A, B) y Ly6C (monocitos; C, D).

### **Descripción detallada de la invención**

- 10 La invención es como se define en las reivindicaciones. La presente invención proporciona un complejo péptido-polinucleótido capaz de la transfección eficaz del polinucleótido en el citoplasma de una célula con citotoxicidad reducida, en comparación con otros procedimientos de transfección de polinucleótidos conocidos en la materia. Ventajosamente, un complejo péptido-polinucleótido de la invención es estable en presencia de suero y, por lo tanto, es capaz de suministrar de manera eficaz un polinucleótido al citoplasma de una célula *in vivo*. Por consiguiente, la
- 15 presente invención abarca, una composición farmacéutica que comprende un complejo péptido-polinucleótido de la invención, y un procedimiento para utilizar un complejo péptido-polinucleótido de la invención para transfectar el polinucleótido en el citoplasma de una célula.

### **I. COMPLEJO PÉPTIDO-POLINUCLEOTIDO**

- 20 Un aspecto de la presente invención abarca un complejo péptido-polinucleótido como se refiere en las reivindicaciones. Un complejo péptido-polinucleótido de la invención es capaz de la transfección eficaz de un polinucleótido asociado con el péptido en el citoplasma de una célula. El péptido, el polinucleótido, el complejo péptido-polinucleótido y la célula se describen a continuación.

#### **(a) Péptido**

- 25 En un aspecto, un complejo péptido-polinucleótido de la invención comprende un péptido. En general, y como se describe en los ejemplos, un péptido de la invención procede de la melitina y se modifica para atenuar su citotoxicidad mientras mantiene su propensión a interactuar con bicapas de membrana. Además, el péptido es sustancialmente no lítico y no citotóxico para las células. Un complejo péptido-polinucleótido de la invención comprende un péptido que (1) es capaz de afectar a la liberación de un polinucleótido desde un endosoma de una célula, y (2) comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 80 % de identidad con la secuencia de
- 30 aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

- Como se utiliza en el presente documento, la frase "funciona sustancialmente similar a un péptido que comprende la SEQ ID NO: 1" se refiere a un péptido sustancialmente no lítico y/o no citotóxico que es capaz de afectar a la liberación de un polinucleótido de un endosoma. En algunas realizaciones, un péptido de la invención es no lítico. La expresión "no lítico" significa que la bicapa lipídica de una célula normalmente no está comprometida en contacto con el péptido. La integridad de la bicapa lipídica puede evaluarse mediante la entrada o salida inadecuada de componentes celulares o extracelulares en una célula. Por ejemplo, las proteínas celulares y/u orgánulos pueden escaparse de una célula con una bicapa lipídica comprometida. Como alternativa, los componentes extracelulares (es decir, aquellos que normalmente no entran a través de uniones comunicantes, por ejemplo) pueden entrar en una célula con una bicapa lipídica comprometida. Se debe tener en cuenta, sin embargo, que el péptido puede
- 40 penetrar la bicapa lipídica de una célula y entrar al interior de la célula, pero al hacerlo, la integridad de la bicapa lipídica no se ve afectada. En otras realizaciones, un péptido de la invención es sustancialmente no citotóxico. La expresión "no citotóxico" indica que la célula normalmente no se destruye en contacto con el péptido. Normalmente, un péptido de la invención disminuye la viabilidad celular en no más de aproximadamente el 10 %, más preferentemente no más de aproximadamente el 7 %, más preferentemente no más de aproximadamente el 5 %, o
- 45 más preferentemente no más de aproximadamente el 3 %. En determinadas realizaciones, un péptido de la invención es no lítico y no citotóxico.

- Como se describe en la **Sección I (b) y (c)** a continuación, un péptido de un complejo de la invención es capaz de asociarse con un polinucleótido. Por lo tanto, en un aspecto, un péptido de un complejo de la invención comprende al menos una región catiónica que interactúa con un polinucleótido. Normalmente, una región catiónica tiene 2 o más aminoácidos básicos contiguos. Cabe destacar que, un péptido de un complejo de la invención también posee una capacidad endosomolítica, que le permite afectar la liberación de un polinucleótido desde un endosoma y hacia el citoplasma de una célula. El término "endosomolítico" se puede utilizar para describir sustancias que inician o facilitan la lisis de los endosomas. Como se describe en los ejemplos, la protonación de restos de histidina de un péptido de un complejo de la invención promueve el desensamblaje del complejo péptido-polinucleótido, que libera el péptido para permeabilizar la membrana endosomal para la liberación de polinucleótidos. Por lo tanto, en otro
- 50 aspecto, un péptido de un complejo de la invención comprende uno o más restos de histidina localizados adyacentes a o dentro de al menos una región catiónica del péptido. A modo de ejemplo no limitativo, si un péptido de un complejo de la invención comprende tres regiones catiónicas, el péptido puede tener al menos una histidina adyacente a o dentro de la primera región catiónica del péptido, al menos una histidina adyacente a o dentro de la
- 55

segunda región catiónica del péptido, al menos una histidina adyacente a o dentro de la tercera región catiónica del péptido, al menos una histidina adyacente a o dentro de cada una de la primera y segunda región catiónica del péptido, al menos una histidina adyacente a o dentro de cada una de la primera y tercera región catiónica del péptido, al menos una histidina adyacente a o dentro de cada una de la segunda y tercera región catiónica del péptido, o al menos una histidina adyacente a o dentro de cada una de la primera, segunda y tercera región catiónica del péptido. Un resto de histidina adyacente a una región catiónica puede colocarse antes o después de la región catiónica. En algunas realizaciones, un resto de histidina adyacente a una región catiónica está inmediatamente adyacente a la región. En otras realizaciones, un resto de histidina adyacente a una región catiónica no está inmediatamente adyacente a la región. Por ejemplo, el resto de histidina puede estar en aproximadamente 2, 3, 4 o 5 posiciones de la región catiónica. En otras realizaciones, un resto de histidina está dentro de una región catiónica. La capacidad endosomolítica de un péptido de un complejo de la invención evita la necesidad de agentes endosomolíticos adicionales, tales como cloroquina, péptidos fusogénicos, adenovirus inactivados y polietilenimina, para liberar polinucleótidos transfectados de endosomas para el suministro en el citoplasma de una célula. Dichos agentes endosomolíticos conocidos tienen efectos negativos sobre las células y pueden aumentar la citotoxicidad durante la transfección.

En algunas realizaciones, un péptido de un complejo de la invención comprende la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, un péptido de un complejo de la invención consiste en la SEQ ID NO: 1. En determinadas realizaciones, un péptido de un complejo de la invención es una variante de la SEQ ID NO: 1, en el que la variante comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 1 y funciona sustancialmente similar a un péptido que comprende la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, un péptido de un complejo de la invención puede abarcar al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos contiguos de la SEC ID NO: 1. En algunas realizaciones, un péptido de un complejo de la invención puede seleccionarse de la Tabla A.

**Tabla A**

SEQ ID NO.	Secuencia	SEQ ID NO.	Secuencia
1	VLTTGLPALISWIRRRHRRHC	26	LPALISWIRRRH
2	VLTTGLPALISWIRRRH	27	LPALISWIRRRHR
3	VLTTGLPALISWIRRRHR	28	LPALISWIRRRHRR
4	VLTTGLPALISWIRRRHRR	29	LPALISWIRRRHRRH
5	VLTTGLPALISWIRRRHRRH	30	LPALISWIRRRHRRHC
6	LTTGLPALISWIRRRH	31	PALISWIRRRH
7	LTTGLPALISWIRRRHR	32	PALISWIRRRHR
8	LTTGLPALISWIRRRHRR	33	PALISWIRRRHRR
9	LTTGLPALISWIRRRHRRH	34	PALISWIRRRHRRH
10	LTTGLPALISWIRRRHRRHC	35	PALISWIRRRHRRHC
11	TTGLPALISWIRRRH	36	ALISWIRRRH
12	TTGLPALISWIRRRHR	37	ALISWIRRRHR
13	TTGLPALISWIRRRHRR	38	ALISWIRRRHRR
14	TTGLPALISWIRRRHRRH	39	ALISWIRRRHRRH
15	TTGLPALISWIRRRHRRHC	40	ALISWIRRRHRRHC
16	TGLPALISWIRRRH	41	LISWIRRRHR
17	TGLPALISWIRRRHR	42	LISWIRRRHRR
18	TGLPALISWIRRRHRR	43	LISWIRRRHRRH
19	TGLPALISWIRRRHRRH	44	LISWIRRRHRRHC
20	TG LPALISWIRRRHRRHC	45	ISWIRRRHRR
21	GLPALISWIRRRH	46	ISWIRRRHRRH
22	GLPALISWIRRRHR	47	ISWIRRRHRRHC
23	GLPALISWIRRRHRR	48	SWIRRRHRRH
24	GLPALISWIRRRHRRH	49	SWIRRRHRRHC
25	G LPALISWIRRRHRRHC	50	WIRRRHRRHC

En una realización preferente, un péptido de un complejo de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, en la que el péptido es no lítico y es capaz de afectar a la liberación de un polinucleótido de un endosoma de una célula. El péptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, puede tener aproximadamente el 80 %, preferentemente aproximadamente el 85 %, más preferentemente aproximadamente el 90 %, más preferentemente

aproximadamente el 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. Un péptido de un complejo de la invención que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 puede comprender uno o más aminoácidos que se han sustituido de forma conservadora. Por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o más de nueve aminoácidos pueden estar sustituidos de forma conservadora, siempre y cuando el péptido resultante funcione sustancialmente similar a un péptido que comprende la SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 y codifica un péptido que es no lítico y es capaz de afectar a la liberación de un polinucleótido de un endosoma de una célula. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos tiene al menos el 80 % de identidad, al menos el 85 % de identidad, al menos el 90 % de identidad o al menos el 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO: 1.

Un péptido de la divulgación puede producirse utilizando una variedad de técnicas conocidas en la materia. Los péptidos pueden aislarse utilizando técnicas estándar, pueden sintetizarse utilizando técnicas estándar, o pueden comprarse u obtenerse de un depósito.

Un péptido de la divulgación puede estar marcado. Los ejemplos no limitantes de marcadores adecuados incluyen marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores radiactivos, marcadores colorimétricos y marcadores de resonancia. Los procedimientos para marcar péptidos son bien conocidos en la materia.

Un péptido puede estar unido a un complejo de carga. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "complejo de carga" puede referirse a cualquier molécula o agente que pueda ser transportado por o unido al péptido distinto de un polinucleótido de la invención. Dicho de otra manera, un péptido de la divulgación puede unirse a un complejo de carga además de a un polinucleótido de un complejo de la invención. Por ejemplo, un complejo de carga puede ser una carga de imágenes, una carga terapéutica, una carga citotóxica o una carga diana.

Los ejemplos no limitativos de moléculas y agentes de carga de imágenes pueden incluir cualquier molécula, agente o material que tenga una propiedad física o química detectable. Dichas cargas de imágenes han sido bien desarrolladas en el campo de imágenes fluorescentes, imágenes de resonancia magnética, tomografía por emisión de positrones, imágenes Raman, tomografía de coherencia óptica, imágenes fotoacústicas, imágenes infrarrojas transformadas de Fourier o inmunoensayos y, en general, casi cualquier marcador útil en tales procedimientos pueden aplicarse a la presente invención. Para una revisión de varios sistemas de marcaje o de producción de señales que se pueden utilizar, véase la patente de Estados Unidos n.º 4391904.

Los ejemplos no limitantes de carga terapéutica pueden incluir cualquier sustancia que tenga una actividad biológica, tales como agentes farmacológicos. Dicha carga terapéutica puede incluir analgésicos, antipiréticos, antiasmáticos, antibióticos, antidepresivos, antidiabéticos, agentes antifúngicos, agentes antihipertensivos, antiinflamatorios incluidos los no esteroides y los esteroides, antineoplásicos, agentes contra la ansiedad, agentes inmunosupresores, agentes antimigrañosos, sedantes, hipnóticos, agentes antianginosos, agentes antipsicóticos, agentes antimaníacos, antiarrítmicos, agentes antiartríticos, agentes antigota, anticoagulantes, agentes trombolíticos, agentes antifibrinolíticos, agentes hemorreológicos, agentes antiplaquetarios, anticonvulsivos, agentes antiparkinsonianos, antihistamínicos, agentes antirrestenosis, antipruríticos, agentes útiles para la regulación del calcio, agentes antibacterianos, agentes antivirales, antimicrobianos, antiinfecciosos, broncodilatadores, compuestos esteroideos y hormonas, y combinaciones de los mismos. Como alternativa, un complejo de carga puede estar en forma de componentes de complejos moleculares o sales farmacológicamente aceptables.

La carga citotóxica se refiere a una molécula o agente que es perjudicial para (por ejemplo, mata o daña) una célula. Los ejemplos pueden incluir medicamentos antimicrotúbulos como los taxoles (paclitaxel, docetaxel) y alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina). Por ejemplo, los ejemplos pueden incluir taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracenediona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

Una carga diana puede ser cualquier molécula o agente que dirija un complejo péptido-polinucleótido de la invención a una célula. Una carga diana puede dirigirse a una célula diana eucariota o una célula diana procariota. Los ejemplos no limitantes de agentes diana pueden incluir un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, un ligando receptor, una molécula pequeña, un péptido, un polipéptido, un lípido, un carbohidrato, un ácido nucleico, un ARNip, un ARNhc, un ARN antisentido, un dendrímero, una microburbuja o un aptámero.

Los medios por los cuales un complejo de carga está unido a un péptido de un complejo de la invención pueden variar y variarán dependiendo de la realización. Un complejo de carga puede estar unido a un péptido de un complejo de la invención mediante cualquier medio conocido en la materia, que incluye covalentemente o no covalentemente.

#### **(b) Polinucleótido**

En otro aspecto, un complejo péptido-polinucleótido de la invención comprende un polinucleótido. Un polinucleótido

puede ser monocatenario, bicatenario o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, un polinucleótido es bicatenario. En otras realizaciones, un polinucleótido es monocatenario. En algunas otras realizaciones, un polinucleótido es una combinación de monocatenario y bicatenario.

Un polinucleótido de un complejo de la invención puede comprender un ácido ribonucleico (ARN), un ácido desoxirribonucleico (ADN) o una combinación de ARN y ADN. De manera adicional, un polinucleótido puede comprender bases de ácido nucleico modificadas, tales como bases de ADN modificadas o bases de ARN modificadas. Las modificaciones pueden ocurrir en, pero no están restringidas a, la posición 2' del azúcar, la posición C-5 de las pirimidinas y la posición 8 de las purinas. Los ejemplos de bases de ADN o ARN modificadas adecuadas incluyen nucleótidos 2'-fluoro, nucleótidos 2'-amino, nucleótidos 5'-aminoalil-2'-fluoro y nucleótidos fosforotioato (monotiofosfato y ditiofosfato). Como alternativa, un polinucleótido puede ser un imitador de nucleótido. Los ejemplos de imitadores de nucleótidos incluyen ácidos nucleicos bloqueados (LNA, de sus siglas en inglés), ácidos nucleicos peptídicos (PNA, de sus siglas en inglés) y oligómeros de morfolino fosforodiamidato (PMO, de sus siglas en inglés).

En algunas realizaciones, un polinucleótido de un complejo de la invención es una combinación de ARN y ADN. En otras realizaciones, un polinucleótido comprende ADN. Cuando un polinucleótido es ADN, el polinucleótido puede comprender un casete de expresión. Como se utiliza en el presente documento, un "casete de expresión" es una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína o péptido unido de forma operativa a un promotor. En determinadas realizaciones, una construcción de ácido nucleico comprende además secuencias reguladoras adicionales. Un ejemplo no limitativo de una secuencia reguladora adicional incluye una secuencia de terminación de la transcripción. Otras secuencias reguladoras adicionales son conocidas en la materia. Como se utiliza en el presente documento, el término promotor puede significar una molécula sintética o de origen natural capaz de conferir o activar la expresión de una secuencia de ácido nucleico diana en una célula. Un promotor puede ser el promotor normalmente asociado con un polinucleótido de ADN de un complejo de la invención, o puede ser un promotor heterólogo. Un promotor heterólogo puede proceder de fuentes tales como virus, bacterias, hongos, plantas, insectos y animales. Un promotor puede regular la expresión de una secuencia de ADN de forma constitutiva o diferencial con respecto a la célula, el tejido u órgano en el que se produce la expresión. O, un promotor puede regular la expresión con respecto a la etapa de desarrollo, o en respuesta a estímulos externos tales como tensiones fisiológicas, patógenos, iones metálicos o agentes inductores o activadores (es decir, un promotor inducible). Los ejemplos representativos no limitantes de promotores pueden incluir el promotor T7 de bacteriófago, promotor T3 de bacteriófago, promotor SP6, promotor basal HSP70, operador-promotor lac, promotor tac, promotor tardío SV40, promotor temprano SV40, promotor RSV-LTR, promotor IE de CMV, un promotor que comprende la secuencia de ácido nucleico del elemento de respuesta de tetraciclina (TRE, de sus siglas en inglés) y el promotor IE de CMV. En algunas alternativas de estas realizaciones, un polinucleótido de ADN de un complejo de la invención se incorpora a un vector. Un experto en la materia sería capaz de construir un vector mediante técnicas recombinantes estándar (véase, por ejemplo, Sambrook y col., 2001 y Ausubel y col., 1996). Los vectores incluyen pero no se limitan a plásmidos, cósmidos, elementos transponibles, virus ( bacteriófagos, virus animales y virus de plantas) y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC), tales como vectores retrovirales (por ejemplo, procedentes de vectores de virus de leucemia murina Moloney (MoMLV, de sus siglas en inglés), MSCV, SFFV, MPSV, SNV etc.), vectores lentivirales (por ejemplo, procedentes de VIH-1, VIH-2, VIS, VIB, VIF etc.), vectores adenovirales (Ad) que incluyen replicación competente, replicación deficiente y formas débiles de los mismos, vectores virales adenoasociados (AAV, de sus siglas en inglés), vectores de virus de simio 40 (SV-40), vectores de virus del papiloma bovino, virus de Epstein Barr, vectores de virus del Herpes, vectores de virus vaccinia, vectores de virus de tumor mamario bovino, vectores de virus de tumor mamario murino y vectores de virus del sarcoma de Rous.

En algunas otras realizaciones, un polinucleótido comprende ARN. Los ejemplos no limitantes de secuencias de ARN pueden incluir ARNm capaz de codificar una proteína y ARN no codificante como el ARNt, ARNr, ARNpn, microARN, ARNip, ARNpi y el ARN no codificante largo (ARNncl). Por ejemplo, un ácido nucleico puede comprender ARNm. En realizaciones preferidas, cuando un ácido nucleico comprende ARNm, la molécula de ARNm puede estar cubierta en 5', poliadenilada o cubierta y poliadenilada. Como alternativa, una molécula de ARNm puede comprender un sitio de entrada ribosomal interno (IRES, de sus siglas en inglés) para la traducción de un marco de lectura abierto interno del ARNm.

En determinadas realizaciones, un polinucleótido comprende un ARN no codificante capaz de regular o inhibir la expresión de una secuencia de ácido nucleico expresada en una célula. Los ejemplos no limitantes de ARN no codificante capaz de regular o inhibir la expresión de una secuencia de ácido nucleico expresada en una célula incluyen microARN (también conocidos como miARN), ARNip, ARNpi y ARNncl. En general, la transfección de una célula con un ARN no codificante capaz de regular o inhibir la expresión de una secuencia de ácido nucleico puede conducir a la escisión de la secuencia de ácido nucleico, puede mejorar, prevenir o alterar la traducción de la secuencia de ácido nucleico en una proteína, o puede regular la transcripción de una secuencia de ácido nucleico.

En realizaciones preferidas, un polinucleótido de un complejo de la invención comprende un ARN no codificante capaz de alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico expresada en una célula. Como se utiliza en el presente documento, "que altera la expresión de una secuencia de ácido nucleico" puede utilizarse para describir cualquier disminución en el nivel de expresión de una secuencia de ácido nucleico, o una proteína traducida de la secuencia de ácido nucleico, cuando se compara con un nivel de expresión de la secuencia de ácido nucleico en

una célula que no se trató con un complejo péptido-polinucleótido de la invención. En algunas alternativas de las realizaciones, un polinucleótido comprende un ARN de interferencia pequeño (ARNip).

- 5 En una realización preferente, un polinucleótido de un complejo de la invención comprende un ARN no codificante capaz de alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3. En otra realización preferida, un polinucleótido de un complejo de la invención comprende un ARN no codificante capaz de alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica JNK2. En determinadas realizaciones preferidas, el ARN no codificante es un ARNip. En otras realizaciones preferidas, el ARN no codificante es un miARN. En aún otras realizaciones preferidas, el ARN no codificante es un ARNhc.
- 10 En todavía otra realización preferente, un polinucleótido de un complejo de la invención comprende un ARN no codificante capaz de alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico normalmente asociada con una ruta de señalización de NFκB. Los ejemplos no limitantes de una ruta de NFκB pueden incluir la ruta de NFκB canónica y la ruta de NFκB no canónica. En determinadas realizaciones preferidas, el ARN no codificante es un ARNip. En otras realizaciones preferidas, el ARN no codificante es un miARN. En aún otras realizaciones preferidas, el ARN no codificante es un ARNhc.
- 15 Los ejemplos no limitantes de una secuencia de ácido nucleico normalmente asociada con la ruta de señalización de NFκB canónica pueden incluir un ácido nucleico que codifica la subunidad p65 del factor de transcripción de la ruta de señalización de NFκB canónica y un ácido nucleico que codifica la subunidad p105/p50 del factor de transcripción de la ruta de señalización de NFκB canónica. En una alternativa de las realizaciones, un polinucleótido de un complejo de la invención comprende un ARN no codificante capaz de alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica la subunidad p105/p50 de la ruta de señalización de NFκB canónica. En otra alternativa de las realizaciones, un polinucleótido de un complejo de la invención comprende un ARN no codificante capaz de alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica la subunidad p65 de la ruta de señalización de NFκB canónica. En una realización de ejemplo, un polinucleótido de un complejo de la invención comprende un ARNip con una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 51 (GGAGUACCCUGAAGCUAUA).
- 20 Los ejemplos no limitantes de una secuencia de ácido nucleico normalmente asociada con la ruta de señalización de NFκB canónica pueden incluir un ácido nucleico que codifica la subunidad p100/p52 de la ruta de señalización de NFκB no canónica y un ácido nucleico que codifica la subunidad RelB de la ruta de señalización de NFκB no canónica. En una alternativa de las realizaciones, un polinucleótido de un complejo de la invención comprende un ARN no codificante capaz de alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica la subunidad RelB de la ruta de señalización de NFκB no canónica. En otra alternativa de las realizaciones, un polinucleótido de un complejo de la invención comprende un ARN no codificante capaz de alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica la subunidad p100/p52 de la ruta de señalización de NFκB no canónica. En una realización de ejemplo, un polinucleótido de un complejo de la invención comprende un ARNip con una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 52 (GAAAGAAGACAGAGCCUAU).
- 25 En algunas realizaciones, un polinucleótido de un complejo de la invención comprende más de un ARN no codificante capaz de alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico normalmente asociada con una ruta de señalización de NFκB. En realizaciones preferidas, un polinucleótido de un complejo de la invención comprende un ARN no codificante capaz de alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico normalmente asociada con la ruta de señalización de NFκB canónica, y un ARN no codificante capaz de alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico normalmente asociada con la ruta de señalización de NFκB no canónica. En una realización de ejemplo, un polinucleótido de un complejo de la invención comprende un ARN no codificante capaz de alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica la subunidad p65 de la ruta de señalización de NFκB canónica, y un ARN no codificante capaz de alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica la subunidad p100/p52 de la ruta de señalización de NFκB canónica.
- 30 En general, un ARNip comprende una molécula de ARN de doble cadena que varía de aproximadamente 15 a aproximadamente 29 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el ARNip puede tener 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 nucleótidos de longitud. En otras realizaciones, el ARNip puede ser de aproximadamente 16 a aproximadamente 18, de aproximadamente 17 a aproximadamente 19, de aproximadamente 21 a aproximadamente 23, de aproximadamente 24 a aproximadamente 27 o de aproximadamente 27 a aproximadamente 29 nucleótidos de longitud. En una realización preferente, el ARNip puede ser de aproximadamente 21 nucleótidos de longitud. Un ARNip puede opcionalmente comprender además uno o dos salientes monocatenarios, por ejemplo, un saliente de 5' en uno o ambos extremos, un saliente de 3' en uno o ambos extremos, o una combinación de los mismos. El ARNip puede formarse a partir de dos moléculas de ARN que se hibridan entre sí o, como alternativa, puede generarse a partir de un ARN de horquilla corta (ARNhc) (véase más abajo). En algunas realizaciones, las dos cadenas del ARNip pueden ser completamente complementarias, de modo que no existan desajustes o protuberancias en el dúplex formado entre las dos secuencias. En otras realizaciones, las dos cadenas del ARNip pueden ser sustancialmente complementarias, de modo que pueden existir uno o más desajustes y/o protuberancias en el dúplex formado entre las dos secuencias. En determinadas realizaciones, uno o ambos de los extremos 5' del ARNip pueden tener un grupo fosfato, mientras que en otras realizaciones uno o ambos de los extremos 5' carecen de un grupo fosfato. En otras realizaciones, uno o ambos de los extremos 3' del ARNip pueden tener un grupo hidroxilo, mientras que en otras realizaciones uno o ambos de los
- 35  
40  
45  
50  
55  
60

extremos 5' carecen de un grupo hidroxilo.

Una cadena del ARNip, que se conoce como la "cadena antisentido" o "cadena guía", incluye una parte que se hibrida con un transcrito diana. Un transcrito diana se refiere a una secuencia de ácido nucleico expresada por una célula para la cual se desea alterar la expresión. En el contexto de una composición terapéutica de la invención, la alteración de la expresión de un transcrito diana puede producir un efecto beneficioso. En realizaciones preferidas, la cadena antisentido del ARNip puede ser completamente complementaria con una región del transcrito diana, es decir, se hibrida con el transcrito diana sin una sola falta de coincidencia o protuberancia sobre una región diana entre aproximadamente 15 y aproximadamente 29 nucleótidos de longitud, preferentemente al menos 16 nucleótidos de longitud, y más preferentemente aproximadamente de 18-20 nucleótidos de longitud. En otras realizaciones, la cadena antisentido puede ser sustancialmente complementaria a la región diana, es decir, pueden existir uno o más desajustes y/o protuberancias en el dúplex formado por la cadena antisentido y el transcrito diana. Normalmente, los ARNip están dirigidos a secuencias exónicas del transcrito diana. Los expertos en la materia están familiarizados con programas, algoritmos y/o servicios comerciales que diseñan los ARNip para transcritos diana. Un ejemplo ejemplar es el algoritmo de diseño de ARNip de Rosetta (Rosetta Inpharmatics, North Seattle, WA), de ARNip de MISSION® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y de ARNip de siGENOME (Thermo Scientific). El ARNip puede sintetizarse enzimáticamente *in vitro* utilizando procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. Como alternativa, el ARNip puede sintetizarse químicamente utilizando técnicas de síntesis de oligonucleótidos que son bien conocidas en la materia.

En otras realizaciones, el ARN no codificante puede ser un ARN de horquilla corta (ARNhc). En general, un ARNhc es una molécula de ARN que comprende al menos dos porciones complementarias que están hibridadas o que son capaces de hibridarse para formar una estructura de doble cadena suficientemente larga para mediar la interferencia del ARN (como se describió anteriormente), y al menos una porción de cadena única que forma un bucle que conecta las regiones del ARNhc que forman el dúplex. La estructura también puede llamarse estructura de tallo-bucle, siendo el tallo la parte dúplex. En algunas realizaciones, la parte dúplex de la estructura puede ser completamente complementaria, de modo que no existan desajustes o protuberancias en la región dúplex del ARNhc. En otras realizaciones, la parte dúplex de la estructura puede ser sustancialmente complementaria, de modo que pueden existir uno o más desajustes y/o protuberancias en la parte dúplex del ARNhc. El bucle de la estructura puede tener una longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 nucleótidos, preferentemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 nucleótidos de longitud, y más preferentemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 9 nucleótidos de longitud. El bucle puede ubicarse en el extremo 5' o 3' de la región que es complementaria al transcrito diana (es decir, la porción antisentido del ARNhc).

El ARNhc puede comprender además un saliente en el extremo 5' o 3'. El saliente opcional puede tener una longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 nucleótidos, y más preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 nucleótidos. En algunas realizaciones, el saliente puede comprender uno o más restos de U, por ejemplo, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 restos de U. En algunas realizaciones, el extremo 5' del ARNhc pueden tener un grupo fosfato, mientras que en otras realizaciones puede no tenerlo. En otras realizaciones, el extremo 3' del ARNhc pueden tener un grupo hidroxilo, mientras que en otras realizaciones puede no tenerlo. En general, los ARNhc se procesan en los ARNip mediante la maquinaria de ARNi celular conservada. Por lo tanto, los ARNhc son precursores de los ARNip y son igualmente capaces de inhibir la expresión de un transcrito diana que es complementario de una porción del ARNhc (es decir, la porción antisentido del ARNhc). Los expertos en la materia están familiarizados con los recursos disponibles (como se detalla anteriormente) para el diseño y síntesis de ARNhc. Un ejemplo de ello son los ARNhc de MISSION® (Sigma-Aldrich).

En aún otras realizaciones, el ARN no codificante puede ser un vector de expresión de ARNi de interferencia de ARN (ARNi). Normalmente, un vector de expresión de ARNi puede utilizarse para la síntesis intracelular (*in vivo*) de agentes de ARNi, tales como miARN, ARNip o ARNhc. En una realización, pueden transcribirse dos hebras de ARNip complementarias separadas utilizando un solo vector que contiene dos promotores, cada uno de los cuales dirige la transcripción de una única cadena de ARNip (es decir, cada promotor está unido de manera operativa a una plantilla para el ARNip para que pueda ocurrir la transcripción). Los dos promotores pueden estar en la misma orientación, en cuyo caso cada uno está unido operativamente a una plantilla para una de las cadenas de ARNip complementarias. Como alternativa, los dos promotores pueden estar en orientaciones opuestas, flanqueando una sola plantilla de modo que la transcripción para los promotores dé lugar a la síntesis de dos cadenas de ARNip complementarias. En otra realización, el vector de expresión de ARNi puede contener un promotor que impulsa la transcripción de una única molécula de ARN que comprende dos regiones complementarias, de modo que la transcripción forma un ARNhc.

En términos generales, los promotores utilizados para dirigir *in vivo* la expresión de una o más unidades de transcripción de ARNip o ARNhc pueden ser promotores de la ARN polimerasa III (Pol III). Ciertos promotores de Pol III, tales como los promotores U6 o H1, no requieren elementos reguladores que actúen en cis dentro de la región transcrita, y por lo tanto, se prefieren en ciertas realizaciones. En otras realizaciones, los promotores para Pol II pueden utilizarse para dirigir la expresión de una o más unidades de transcripción de ARNip o ARNhc. En algunas realizaciones, pueden utilizarse promotores Pol II específicos de tejido, específicos de célula o inducibles.

Un constructo que proporciona una plantilla para la síntesis de ARNip o ARNhc puede producirse utilizando

procedimientos estándar de ADN recombinante e insertarse en cualquiera de una amplia variedad de vectores diferentes adecuados para la expresión en células eucariotas. Se pueden encontrar directrices en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y col., John Wiley & Sons, New York, 2003) o Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook & Russell, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 3ª edición, 2001). Los expertos en la materia también aprecian que los vectores pueden comprender secuencias reguladoras adicionales (por ejemplo, secuencia de terminación, secuencia de control de traducción, etc.), así como secuencias de marcadores seleccionables. Los plásmidos de ADN son conocidos en la materia, incluidos los basados en pBR322, PUC y otros. Dado que muchos vectores de expresión ya contienen un promotor o promotores adecuados, puede que solo sea necesario insertar la secuencia de ácido nucleico que codifica el agente de ARNi de interés en una ubicación apropiada con respecto al promotor o promotores. Los vectores virales también pueden utilizarse para proporcionar la expresión intracelular de agentes de ARNi. Los vectores virales adecuados incluyen vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores adenovirales, vectores de virus adenoasociados, vectores de virus de herpes, y otros. En realizaciones preferidas, el vector de expresión de ARNi es un vector basado en lentiviral o partícula lentiviral de ARNhc, como el proporcionado en los productos de ARNhc de MISSION® TRC (Sigma-Aldrich).

Las secuencias de ácido nucleico de la divulgación pueden obtenerse utilizando una variedad de diferentes técnicas conocidas en la materia. Las secuencias de nucleótidos, así como las secuencias homólogas, pueden aislarse utilizando técnicas estándar, compradas u obtenidas de un depósito. Una vez que se obtiene la secuencia de nucleótidos, puede amplificarse para su uso en una variedad de aplicaciones, utilizando procedimientos conocidos en la materia.

### **(c) Complejo polipéptido-polinucleótido**

En otro aspecto de la invención, un polipéptido y un polinucleótido de la invención se asocian para formar un complejo. Como se utiliza en el presente documento, el término "asociado" puede referirse a la interacción de un péptido y un polinucleótido a través de enlaces no covalentes, o al enlace covalente de un péptido y un polinucleótido. En realizaciones preferidas, un polipéptido y un polinucleótido de un complejo de la invención se asocian a través de enlaces no covalentes tales como un enlace de hidrógeno, un enlace iónico, un enlace basado en Van der Waals, un enlace hidrófobo o interacciones electrostáticas. Por ejemplo, un péptido de un complejo de la invención puede tener una carga neta positiva global, que puede permitir que el péptido se asocie con un polinucleótido de un complejo de la invención a través de interacciones electrostáticas para formar un complejo de la invención. Los procedimientos para formar un complejo polipéptido-polinucleótido de la invención se conocen en la materia y se describen adicionalmente en la **Sección V** y en los Ejemplos.

La relación molar de péptido a polinucleótido a la que un péptido se asocia con un polinucleótido para formar un complejo de la invención puede variar y variará dentro de la relación molar definida en las reivindicaciones dependiendo del péptido, la composición del polinucleótido o el tamaño del polinucleótido y puede determinarse experimentalmente. En esencia, una relación molar adecuada de un péptido a un polinucleótido puede ser una relación molar en la que el péptido forma un complejo completamente con el polinucleótido, mientras minimiza la exposición de un sujeto al péptido.

De acuerdo con la invención, un péptido se asocia con un polinucleótido para formar un complejo de la invención en una relación molar de péptido a polinucleótido que es más de aproximadamente 50:1 y menos de aproximadamente 200:1.

En algunas realizaciones, un péptido y un polinucleótido de la invención se asocian en una relación molar de péptido a polinucleótido de al menos aproximadamente 50:1. En realizaciones adicionales, un péptido y un polinucleótido de la invención se asocian en una relación molar de péptido a polinucleótido de al menos aproximadamente 75:1. En otras realizaciones adicionales, un péptido y un polinucleótido de la invención se asocian en una relación molar de péptido a polinucleótido de al menos aproximadamente 100:1.

Cuando un polinucleótido es ARNip, una relación molar adecuada de un péptido a un polinucleótido capaz de formar complejo completamente con el polinucleótido de ARNip puede ser más de aproximadamente 50:1, pero menos de aproximadamente 200:1 para minimizar la exposición de un sujeto al péptido. Dicho de otra manera, en algunas realizaciones, una relación molar de un péptido y un polinucleótido de ARNip de la invención puede estar entre aproximadamente 50:1 y aproximadamente 200:1. En otras realizaciones, una relación molar de un péptido y un polinucleótido de ARNip de la invención puede ser de aproximadamente 50:1, aproximadamente 51:1, aproximadamente 52:1, aproximadamente 53:1, aproximadamente 54:1 o aproximadamente 55:1. En otras realizaciones, una relación molar de un péptido y un polinucleótido de ARNip de la invención puede ser de aproximadamente 70:1, aproximadamente 71:1, aproximadamente 72:1, aproximadamente 73:1, aproximadamente 74:1, aproximadamente 75:1, aproximadamente 76:1, aproximadamente 77:1, aproximadamente 78:1, aproximadamente 79:1 o aproximadamente 80:1. En algunas otras realizaciones, una relación molar de un péptido y un polinucleótido de ARNip de la invención puede ser de aproximadamente 95:1, aproximadamente 96:1, aproximadamente 97:1, aproximadamente 98:1, aproximadamente 99:1, aproximadamente 100:1, aproximadamente 101:1, aproximadamente 102:1, aproximadamente 103:1, aproximadamente 104:1 o aproximadamente 105:1. En aún otras realizaciones, una relación molar de un péptido y un polinucleótido de ARNip de la invención puede ser de aproximadamente 145:1, aproximadamente 146:1, aproximadamente 147:1, aproximadamente 148:1,

aproximadamente 149:1, aproximadamente 150:1, 151:1, aproximadamente 152:1, aproximadamente 153:1, aproximadamente 154:1 o aproximadamente 155:1. En otras realizaciones, una relación molar de un péptido y un polinucleótido de ARNip de la invención puede ser de aproximadamente 195:1, aproximadamente 196:1, aproximadamente 197:1, aproximadamente 198:1, aproximadamente 199:1, aproximadamente 200:1. En una realización preferente, una relación molar de un péptido y un polinucleótido de ARNip de la invención puede ser de aproximadamente 150:1. En otra realización preferida, una relación molar de un péptido y un polinucleótido de ARNip de la invención puede ser de aproximadamente 100:1. En otra realización preferida, una relación molar de un péptido y un polinucleótido de ARNip de la invención puede ser de aproximadamente 50:1. En otra realización preferida, una relación molar de un péptido y un polinucleótido de ARNip de la invención puede estar entre aproximadamente 50:1 y aproximadamente 100:1. En otra realización preferida, una relación molar de un péptido y un polinucleótido de ARNip de la invención puede estar entre aproximadamente 75:1 y aproximadamente 150:1.

Los procedimientos para determinar una relación molar en la que el péptido es capaz de formar complejo completamente con el polinucleótido son conocidos en la materia, y pueden incluir ensayos de retardo de gel como se describe en los ejemplos. Los procedimientos para determinar una relación molar en la que la exposición de un sujeto al péptido se minimiza son conocidos en la materia, y pueden incluir mediciones de citotoxicidad utilizando dosis crecientes del polipéptido.

Un complejo péptido-polinucleótido de la invención puede tener de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 999 nm de diámetro, más preferentemente de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 500 nm de diámetro, más preferentemente de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 250 nm de diámetro. Como tal, un complejo péptido-polinucleótido de la invención puede denominarse "nanopartícula". En algunas realizaciones, una nanopartícula de la invención tiene aproximadamente 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, o aproximadamente 120 nm de diámetro. En otras realizaciones, una nanopartícula de la invención tiene aproximadamente 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, o 220 nm de diámetro. En otras realizaciones, una nanopartícula de la invención tiene aproximadamente 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, o 270 nm de diámetro. En otras realizaciones, una nanopartícula de la invención tiene aproximadamente 280, 285, 290, 295, 300, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, o 345 nm de diámetro. En otras realizaciones, una nanopartícula de la invención tiene aproximadamente 350, 355, 360, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, o 415 nm de diámetro. En otras realizaciones, una nanopartícula de la invención tiene aproximadamente 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, o 500 nm de diámetro. En otras realizaciones, una nanopartícula de la invención tiene aproximadamente 570, 575, 580, 585, 590, 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, o 630 nm de diámetro.

En una realización preferente, una nanopartícula de la invención tiene aproximadamente de 50 a aproximadamente 250 nm de diámetro. Por ejemplo, una nanopartícula de la invención puede tener aproximadamente 50, aproximadamente 51, aproximadamente 52, aproximadamente 53, aproximadamente 54, aproximadamente 55, aproximadamente 56, aproximadamente 57, aproximadamente 58, aproximadamente 59, aproximadamente 60, aproximadamente 61, aproximadamente 62, aproximadamente 63, aproximadamente 64, aproximadamente 65, aproximadamente 66, aproximadamente 67, aproximadamente 68, aproximadamente 69, aproximadamente 70, aproximadamente 71, aproximadamente 72, aproximadamente 73, aproximadamente 74, aproximadamente 75, aproximadamente 76, aproximadamente 77, aproximadamente 78, aproximadamente 79, aproximadamente 80, aproximadamente 81, aproximadamente 82, aproximadamente 83, aproximadamente 84, aproximadamente 85, aproximadamente 86, aproximadamente 87, aproximadamente 88, aproximadamente 89, aproximadamente 90, aproximadamente 91, aproximadamente 92, aproximadamente 93, aproximadamente 94, aproximadamente 95, aproximadamente 96, aproximadamente 97, aproximadamente 98, aproximadamente 99, aproximadamente 100, aproximadamente 101, aproximadamente 102, aproximadamente 103, aproximadamente 104, aproximadamente 105, aproximadamente 106, aproximadamente 107, aproximadamente 108, aproximadamente 109, aproximadamente 110, aproximadamente 111, aproximadamente 112, aproximadamente 113, aproximadamente 114, aproximadamente 115, aproximadamente 116, aproximadamente 117, aproximadamente 118, aproximadamente 119, aproximadamente 120, aproximadamente 121, aproximadamente 122, aproximadamente 123, aproximadamente 124, aproximadamente 125, aproximadamente 126, aproximadamente 127, aproximadamente 128, aproximadamente 129, aproximadamente 130, aproximadamente 131, aproximadamente 132, aproximadamente 133, aproximadamente 134, aproximadamente 135, aproximadamente 136, aproximadamente 137, aproximadamente 138, aproximadamente 139, aproximadamente 140, aproximadamente 141, aproximadamente 142, aproximadamente 143, aproximadamente 144, aproximadamente 145, aproximadamente 146, aproximadamente 147, aproximadamente 148, aproximadamente 149, aproximadamente 150, aproximadamente 151, aproximadamente 152, aproximadamente 153, aproximadamente 154, aproximadamente 155, aproximadamente 156, aproximadamente 157, aproximadamente 158, aproximadamente 159, aproximadamente 160, aproximadamente 161, aproximadamente 162, aproximadamente 163, aproximadamente 164, aproximadamente 165, aproximadamente 166, aproximadamente 167, aproximadamente 168, aproximadamente 169, aproximadamente 170, aproximadamente 171, aproximadamente 172, aproximadamente 173, aproximadamente 174, aproximadamente 175, aproximadamente 176, aproximadamente 177, aproximadamente 178, aproximadamente 179, aproximadamente 180, aproximadamente 181, aproximadamente 182, aproximadamente 183, aproximadamente 184, aproximadamente 185, aproximadamente 186, aproximadamente 187, aproximadamente 188, aproximadamente 189, aproximadamente 190,

aproximadamente 191, aproximadamente 192, aproximadamente 193, aproximadamente 194, aproximadamente 195, aproximadamente 196, aproximadamente 197, aproximadamente 198, aproximadamente 199, aproximadamente 200, aproximadamente 201, aproximadamente 202, aproximadamente 203, aproximadamente 204, aproximadamente 205, aproximadamente 206, aproximadamente 207, aproximadamente 208, aproximadamente 209, aproximadamente 210, aproximadamente 211, aproximadamente 212, aproximadamente 213, aproximadamente 214, aproximadamente 215, aproximadamente 216, aproximadamente 217, aproximadamente 218, aproximadamente 219, aproximadamente 220, aproximadamente 221, aproximadamente 222, aproximadamente 223, aproximadamente 224, aproximadamente 225, aproximadamente 226, aproximadamente 227, aproximadamente 228, aproximadamente 229, aproximadamente 230, aproximadamente 231, aproximadamente 232, aproximadamente 233, aproximadamente 234, aproximadamente 235, aproximadamente 236, aproximadamente 237, aproximadamente 238, aproximadamente 239, aproximadamente 240, aproximadamente 241, aproximadamente 242, aproximadamente 243, aproximadamente 244, aproximadamente 245, aproximadamente 246, aproximadamente 247, aproximadamente 248, aproximadamente 249 o aproximadamente 250 nm de diámetro. En otra realización preferida, una nanopartícula de la invención tiene aproximadamente de 50 a aproximadamente 200 nm de diámetro. En otra realización preferida, una nanopartícula de la invención tiene aproximadamente de 50 a aproximadamente 150 nm de diámetro. En otra realización preferida, una nanopartícula de la invención tiene aproximadamente de 50 a aproximadamente 100 nm de diámetro. En otra realización preferida, una nanopartícula de la invención tiene aproximadamente de 75 a aproximadamente 125 nm de diámetro. En otra realización preferida, una nanopartícula de la invención tiene aproximadamente de 100 a aproximadamente 150 nm de diámetro. En otra realización preferida, una nanopartícula de la invención tiene aproximadamente de 125 a aproximadamente 175 nm de diámetro. En otra realización preferida, una nanopartícula de la invención tiene aproximadamente de 150 a aproximadamente 200 nm de diámetro. En otra realización preferida, una nanopartícula de la invención tiene aproximadamente de 175 a aproximadamente 225 nm de diámetro. En otra realización preferida, una nanopartícula de la invención tiene aproximadamente de 200 a aproximadamente 250 nm de diámetro. En otra realización preferida, una nanopartícula de la invención tiene aproximadamente de 180 a aproximadamente 200 nm de diámetro.

En determinadas realizaciones, una nanopartícula que comprende un complejo péptido-polinucleótido de la invención puede comprender un agregado de partículas más pequeñas de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 nm de diámetro. Como tal, una nanopartícula de la invención puede comprender un agregado de partículas más pequeñas de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o aproximadamente 30 nm de diámetro. En algunas realizaciones, una nanopartícula que comprende un complejo péptido-polinucleótido de la invención comprende un agregado de partículas más pequeñas de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o aproximadamente 15 nm de diámetro. En otras realizaciones, una nanopartícula que comprende un complejo péptido-polinucleótido de la invención comprende un agregado de partículas más pequeñas de aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o aproximadamente 20 nm de diámetro. En algunas otras realizaciones, una nanopartícula que comprende un complejo péptido-polinucleótido de la invención comprende un agregado de partículas más pequeñas de aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o aproximadamente 25 nm de diámetro. En otras realizaciones, una nanopartícula que comprende un complejo péptido-polinucleótido de la invención comprende un agregado de partículas más pequeñas de aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o aproximadamente 30 nm de diámetro.

Una nanopartícula de la invención puede modificarse adicionalmente para mejorar la estabilidad de la nanopartícula. Por ejemplo, una nanopartícula de la invención puede recubrirse con albúmina para mejorar la estabilidad. Una nanopartícula de la invención recubierta con albúmina puede tener aproximadamente de 5 a aproximadamente 90 nm o más de diámetro. Como tal, una nanopartícula de la invención puede comprender partículas de aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, o aproximadamente 90 nm de diámetro. En algunas realizaciones, una nanopartícula de la invención comprende partículas de aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25 o aproximadamente 30 nm de diámetro. En otras realizaciones, una nanopartícula de la invención comprende partículas de aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50 o aproximadamente 55 nm de diámetro. En algunas otras realizaciones, una nanopartícula de la invención comprende partículas de aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75 o aproximadamente 80 nm de diámetro. En otras realizaciones, una nanopartícula de la invención comprende partículas de aproximadamente 80, aproximadamente 85 o aproximadamente 90 nm o más de diámetro. En realizaciones preferidas, una nanopartícula de la invención comprende partículas de aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70 o aproximadamente 75 nm de diámetro.

El tamaño de partícula puede evaluarse utilizando procedimientos conocidos en la materia. Los ejemplos no limitantes de procedimientos para medir el tamaño de una partícula pueden incluir dispersión dinámica de la luz, difracción láser, electrozona (zona de detección eléctrica), oscurecimiento de la luz - también conocido como fotozona y detección óptica de partículas individuales (SPOS, de sus siglas en inglés), análisis granulométrico,

medidas aerodinámicas, diámetro de permeabilidad al aire, sedimentación, medición del potencial zeta de la partícula, o combinaciones de las mismas. En una realización preferente, el tamaño de partícula se evalúa mediante dispersión dinámica de la luz. En otra realización preferida, el tamaño de partícula se evalúa midiendo el potencial zeta de la partícula. En todavía otra realización preferente, el tamaño de partícula se evalúa mediante dispersión

5

Una nanopartícula de la invención puede tener un potencial zeta de aproximadamente -15 a aproximadamente 20 mV, preferentemente de aproximadamente 0 mV o más. Por ejemplo, una nanopartícula puede tener un potencial zeta de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19 o aproximadamente 20 mV o más. En algunas realizaciones, una nanopartícula tiene un potencial zeta de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente 5 mV. En otras realizaciones, una nanopartícula tiene un potencial zeta de aproximadamente 10, 11, 12, 13, o aproximadamente 14 mV. En algunas otras realizaciones, una nanopartícula tiene un potencial zeta de aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14 o aproximadamente 15 mV. En una realización de ejemplo, una nanopartícula tiene un potencial zeta de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente 5 mV. En otras realizaciones, una nanopartícula tiene un potencial zeta de aproximadamente 10, aproximadamente 11, 12, aproximadamente 13 o aproximadamente 14 mV. En una realización de ejemplo, una nanopartícula tiene un potencial zeta de aproximadamente 3,72 mV. En otra realización ejemplar, una nanopartícula tiene un potencial zeta de aproximadamente 12 mV. En todavía otra realización ejemplar, una nanopartícula tiene un potencial zeta de aproximadamente 13,1 mV.

10

15

20

Una nanopartícula que comprende un complejo péptido-polinucleótido de la invención puede tener una relación de carga positiva a negativa de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 30:1, preferentemente de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 25:1. En algunas realizaciones, una nanopartícula tiene una relación de carga positiva a negativa de aproximadamente 4:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 6:1, aproximadamente 7:1 o aproximadamente 8:1. En otras realizaciones, una nanopartícula tiene una relación de carga positiva a negativa de aproximadamente 10:1, aproximadamente 11:1, aproximadamente 12:1, aproximadamente 13:1 o aproximadamente 14:1. En algunas otras realizaciones, una nanopartícula tiene una relación de carga positiva a negativa de aproximadamente 22:1, aproximadamente 23:1, aproximadamente 24:1, aproximadamente 25:1 o aproximadamente 26:1.

25

30

Como se describe en la Sección I(a), un complejo péptido-polinucleótido es capaz de liberar eficazmente el polinucleótido en el citoplasma de una célula. Un complejo péptido-polinucleótido también puede ser capaz de proteger al polinucleótido de la degradación tras la administración en un sujeto. Como tal, una nanopartícula péptido-polinucleótido de la invención puede permanecer estable en presencia de suero. Una nanopartícula puede permanecer estable en presencia de suero durante aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60 minutos, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 horas, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días o más. Una nanopartícula puede permanecer estable en presencia de aproximadamente 50, 100, 150, 200, o aproximadamente 300 µg/ml o más de albúmina de suero humano. La estabilidad de una nanopartícula puede determinarse midiendo la capacidad de una nanopartícula para mantener la actividad de un polinucleótido del complejo péptido-polinucleótido de la nanopartícula, o midiendo los cambios en el tamaño de una nanopartícula a lo largo del tiempo. Los procedimientos para medir el tamaño de una nanopartícula pueden ser los descritos en esta Sección.

35

40

Los procedimientos para preparar un complejo péptido-polinucleótido de la invención generalmente comprenden poner en contacto un péptido con un polinucleótido para formar un complejo péptido-polinucleótido. Normalmente, un péptido y un polinucleótido se ponen en contacto mediante la incubación en condiciones adecuadas para que se forme un complejo péptido-polinucleótido. Las condiciones adecuadas para que se forme un complejo péptido-polinucleótido pueden ser las descritas en los ejemplos. Normalmente, dichas condiciones pueden comprender una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C, y tiempos de incubación de entre aproximadamente 20 segundos a aproximadamente 60 minutos o más. Las temperaturas adecuadas también pueden ser inferiores a aproximadamente 30 °C. Por ejemplo, la incubación puede ocurrir en el hielo. Un experto en la materia apreciará que la duración y la temperatura de la incubación pueden variar y variarán dependiendo del péptido y el polinucleótido, y pueden determinarse experimentalmente.

45

50

Una nanopartícula que comprende un complejo péptido-polinucleótido de la invención puede modificarse adicionalmente para mejorar la estabilidad de la nanopartícula. Por ejemplo, un complejo péptido-polinucleótido de la invención puede entrecruzarse para mejorar la estabilidad de las nanopartículas. Un experto en la materia reconocerá que un reticulante adecuado puede variar y variará dependiendo de la composición de la nanopartícula y el anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En algunos aspectos, un complejo péptido-polinucleótido de la invención puede entrecruzarse químicamente utilizando reticulantes químicos tales como glutaraldehído, espaciadores de ácido bis-carboxílico, ésteres activos de ácido bicarboxílico, utilizando un protocolo de acoplamiento de amina/ácido bis-enlazador por carbodiimida, o utilizando un protocolo de química de clic, química del acoplamiento carbodiimida, acilación, acoplamiento éster activo, o alquilación.

55

60

Como alternativa, un complejo péptido-polinucleótido de la invención puede estar cubierto con un componente capaz de mejorar la estabilidad de las nanopartículas. Los procedimientos para modificar una nanopartícula para mejorar la estabilidad son conocidos en la materia, y pueden ser como se describe en Nicolás y col., 2013 Acta Biomater. 9:4754-4762.

5 Como se utiliza en el presente documento, el término "recubrimiento" puede referirse a la interacción de un complejo péptido-polinucleótido con un compuesto a través de enlaces no covalentes, o al enlace covalente de un complejo péptido-polinucleótido y un compuesto. En realizaciones preferidas, un complejo péptido-polinucleótido de la invención y un compuesto de recubrimiento se asocian a través de enlaces no covalentes tales como un enlace de hidrógeno, un enlace iónico, un enlace basado en Van der Waals, un enlace hidrófobo o interacciones electrostáticas. Por ejemplo, un complejo péptido-polinucleótido de la invención puede tener una carga positiva neta global, y un compuesto de recubrimiento puede tener una carga negativa global que puede permitir que el complejo péptido-polinucleótido y el compuesto se asocien a través de interacciones electrostáticas para formar un complejo de la invención.

10 Los ejemplos no limitantes de compuestos que pueden utilizarse para recubrir una nanopartícula para mejorar la estabilidad de la nanopartícula incluyen albúmina, ácidos grasos tales como ácido oleico, polietilenglicol, polisacáridos tales como quitosán, heparina o heparanos y otros glicosaminoglicanos u otros materiales de recubrimiento publicados conocidos por los expertos en la materia. En algunas realizaciones, la estabilidad de un complejo péptido-polinucleótido de la invención puede mejorarse mediante el recubrimiento de nanopartículas con un ácido graso. En otras realizaciones, la estabilidad de un complejo péptido-polinucleótido de la invención puede mejorarse mediante el recubrimiento de nanopartículas con polisacárido.

15 En realizaciones preferidas, la estabilidad de una nanopartícula que comprende un complejo péptido-polinucleótido de la invención puede mejorarse mediante el recubrimiento de nanopartículas con albúmina. Las albúminas son proteínas globulares cargadas negativamente que se encuentran comúnmente en el suero sanguíneo. Aunque sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que recubrir las nanopartículas de la invención con albúmina puede mejorar la estabilidad de las nanopartículas al prevenir la floculación. Preferentemente, las albúminas que se pueden utilizar para recubrir una nanopartícula que comprende un complejo péptido-polinucleótido de la invención son albúminas de suero y pueden incluir albúmina de suero bovino y albúmina de suero humano. En una realización ejemplar, la estabilidad de una nanopartícula que comprende un complejo péptido-polinucleótido de la invención puede mejorarse mediante el recubrimiento de nanopartículas con albúmina de suero humano.

20 En esencia, una nanopartícula se recubre con albúmina mediante la incubación de la nanopartícula con una solución que comprende albúmina. Las nanopartículas pueden incubarse en una solución que comprende aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, o aproximadamente 1 mg/ml o más de albúmina. En algunas realizaciones, las nanopartículas que comprenden un complejo péptido-polinucleótido de la invención pueden incubarse en una solución que comprende aproximadamente 0,1, 0,15, 0,2, 0,25 o aproximadamente 0,3 mg/ml de albúmina. En otras realizaciones, las nanopartículas que comprenden un complejo péptido-polinucleótido de la invención pueden incubarse en una solución que comprende aproximadamente 0,3, 0,35, 0,4, 0,45 o aproximadamente 0,5 mg/ml de albúmina. En algunas otras realizaciones, las nanopartículas que comprenden un complejo péptido-polinucleótido de la invención pueden incubarse en una solución que comprende aproximadamente 0,5, 0,55, 0,6, 0,65 o aproximadamente 0,7 mg/ml de albúmina. En otras realizaciones, las nanopartículas que comprenden un complejo péptido-polinucleótido de la invención pueden incubarse en una solución que comprende aproximadamente 0,7, 0,75, 0,8, 0,85 o aproximadamente 0,9 mg/ml de albúmina. En realizaciones adicionales, las nanopartículas que comprenden un complejo péptido-polinucleótido de la invención pueden incubarse en una solución que comprende aproximadamente 0,9, 0,95, 1 o aproximadamente 1,5 mg/ml de albúmina. En realizaciones preferidas, las nanopartículas que comprenden un complejo péptido-polinucleótido de la invención pueden incubarse en una solución que comprende aproximadamente 0,4, 0,45, 0,5, 0,55 o aproximadamente 0,6 mg/ml de albúmina.

25 Un complejo péptido-polinucleótido puede incubarse con albúmina durante aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, o aproximadamente 60 minutos o más para recubrir el complejo péptido-polinucleótido. En algunas realizaciones, una partícula que comprenden un complejo péptido-polinucleótido de la invención se incuba con albúmina durante aproximadamente 5, 10, 15 o aproximadamente 20 minutos. En otras realizaciones, una partícula que comprenden un complejo péptido-polinucleótido de la invención se incuba con albúmina durante aproximadamente 20, 25, 30 o aproximadamente 35 minutos. En algunas otras realizaciones, una partícula que comprenden un complejo péptido-polinucleótido de la invención se incuba con albúmina durante aproximadamente 35, 40, 45 o aproximadamente 50 minutos. En otras realizaciones, una partícula que comprenden un complejo péptido-polinucleótido de la invención se incuba con albúmina durante aproximadamente 50, 55 o aproximadamente 60 minutos o más. En realizaciones preferidas, una partícula que comprenden un complejo péptido-polinucleótido de la invención se incuba con albúmina durante aproximadamente 25, 30 o aproximadamente 35 minutos.

#### (d) célula

En otro aspecto de la invención, un complejo péptido-polinucleótido de la invención es capaz de transfectar el polinucleótido en el citoplasma de una célula. En algunas realizaciones, una célula es una célula procarionota. En realizaciones preferidas, una célula es una célula eucariota. Una célula puede estar *in vitro*, *in vivo*, *in situ*, o *ex vivo*.

Una célula puede ser una célula única o puede comprender un tejido o un órgano. El término "célula" también se refiere a una célula en un sujeto.

5 Un complejo péptido-polinucleótido de la invención puede administrarse a una célula *in vitro* mediante la incubación de una célula en presencia de un complejo péptido-polinucleótido de la invención en condiciones adecuadas para la transfección de un polinucleótido de un complejo péptido-polinucleótido. Las condiciones adecuadas para la transfección de un polinucleótido en un complejo péptido-polinucleótido pueden ser como se describen en los ejemplos. Un experto en la materia apreciará que la duración de la incubación puede variar y variará dependiendo del complejo péptido-polinucleótidos y de las células. Normalmente, tales condiciones pueden comprender tiempos de incubación de entre aproximadamente diez minutos y 24 horas. Más preferentemente, las condiciones de transfección pueden comprender tiempos de incubación de entre aproximadamente 15 minutos y 3 horas.

10 Un complejo péptido-polinucleótido de la invención puede administrarse a una célula *in vivo* (es decir, en un sujeto) mediante la administración a un sujeto de una composición que comprende un complejo péptido-polinucleótido de la invención. Las composiciones adecuadas se describen con más detalle en la Sección II a continuación.

## II. COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA

15 En otro aspecto de la invención, un complejo péptido-polinucleótido de la invención puede incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración. Una composición farmacéutica de la invención puede utilizarse para alterar la expresión de una o más de una secuencia de ácido nucleico normalmente expresada en una célula. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede utilizarse para alterar la expresión de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más secuencias de ácido nucleico normalmente expresadas en una célula. Un experto en la materia apreciará que las composiciones farmacéuticas pueden administrarse para tratar una enfermedad, para prevenir una enfermedad o para promover una buena salud. Como tal, una composición farmacéutica de la invención puede utilizarse para alterar la expresión de cualquier secuencia de ácido nucleico normalmente expresada en una célula, de tal manera que la expresión alterada conduce a efectos medibles y beneficiosos para el sujeto al que se administra la composición (es decir, eficacia significativa)

25 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de la invención se utiliza para alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico normalmente expresada en una célula. En una realización preferente, una composición farmacéutica de la invención se utiliza para alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3. En otra realización preferida, una composición farmacéutica de la invención se utiliza para alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica JNK2. En todavía otra realización preferente, una composición farmacéutica de la invención se utiliza para alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica la subunidad p65 de la ruta de señalización canónica de NFκB. En otra realización preferida, una composición farmacéutica de la invención se utiliza para alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica la subunidad p100/p52 de la ruta de señalización canónica de NFκB.

35 En otras realizaciones, una composición farmacéutica de la invención se utiliza para alterar la expresión de dos secuencias de ácido nucleico normalmente expresadas en una célula. En una realización preferente, una composición farmacéutica de la invención se utiliza para alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica la subunidad p65 de la ruta de señalización canónica de NFκB, y una secuencia de ácido nucleico que codifica la subunidad p100/p52 de la ruta de señalización canónica de NFκB.

40 Cuando una composición farmacéutica de la invención se utiliza para alterar la expresión de más de una secuencia de ácido nucleico normalmente expresada en una célula, puede formularse una composición farmacéutica utilizando una mezcla de más de un complejo péptido-polinucleótido, en la que cada complejo comprende un polinucleótido capaz de alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico diferente normalmente expresada en una célula. Como alternativa, puede utilizarse más de un polinucleótido para generar una mezcla de complejos péptido-polinucleótido, en los que cada polinucleótido es capaz de alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico diferente normalmente expresada en una célula.

45 Una composición farmacéutica de la invención también puede comprender uno o más portadores, adyuvantes, excipientes y vehículos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, según se desee. Como se utiliza en el presente documento, el lenguaje "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares, compatibles con la administración farmacéutica. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la materia. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con las nanopartículas de la invención, se contempla su uso en las composiciones. Los compuestos activos complementarios también pueden incorporarse en las composiciones.

55 Una composición farmacéutica de la invención puede formularse para que sea compatible con su ruta de administración prevista. Las vías de administración adecuadas incluyen administración parenteral, oral, pulmonar, transdérmica, transmucosa y rectal. El término parenteral, tal como se usa en el presente documento, incluye inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraesternal, o técnicas de infusión.

Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los

siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede incluir en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones orales generalmente pueden incluir un diluyente inerte o un vehículo comestible. Las composiciones orales pueden incluirse en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Para el fin de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales también pueden prepararse utilizando un vehículo fluido para su uso como un enjuague bucal, en el que el compuesto en el vehículo fluido se aplica oralmente y se agita y expectora o se traga. Pueden incluirse agentes de unión farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares, pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa; un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante como la menta, salicilato de metilo, o sabor a naranja. Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de un aerosol desde un recipiente o dispensador a presión que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas como el dióxido de carbono, o un nebulizador.

En realizaciones preferidas, una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con la administración parenteral. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable pueden incluir soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles inyectables. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL (BASF; Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS, de sus siglas en inglés). En una realización ejemplar, una composición farmacéutica de la invención se formula con solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En todos los casos, una composición puede ser estéril y puede ser fluida en la medida en que exista facilidad de inyección. Una composición puede ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y puede conservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante la utilización de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante la utilización de surfactantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, puede ser preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes como el manitol, sorbitol, o cloruro de sodio, en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son secado al vacío y secado por congelación, que produce un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada y filtrada del mismo.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, en la formulación se utilizan penetrantes apropiados para la barrera a permear. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la materia y pueden incluir, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa puede lograrse mediante la utilización de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, pomadas, geles o cremas como se conoce generalmente en la materia. Los compuestos también pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal.

En una realización, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de

suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etileno vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los procedimientos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Estos pueden prepararse de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. N.º 4.522.811.

Formulaciones adicionales de composiciones farmacéuticas pueden estar en, por ejemplo, Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1975) y Liberman, H. A. y Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Nueva York, N.Y. (1980). Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton Pa., 16Ed ISBN: 0-912734-04-3, última edición, proporciona un compendio de técnicas de formulación como son generalmente conocidas por los practicantes.

Un experto en la materia reconocerá que la concentración de un complejo de péptido-polinucleótido de la invención en una composición farmacéutica puede variar y variará dependiendo en parte de la vía de administración, el sujeto y el motivo de la administración, y puede determinarse experimentalmente. Los procedimientos para determinar experimentalmente la concentración de un agente activo tal como las nanopartículas de la invención en una composición farmacéutica son conocidos en la materia. En general, una composición farmacéutica puede formularse para comprender aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 50 µM de un polinucleótido en un complejo péptido-polinucleótido de la invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede formularse para comprender aproximadamente 0,1 nM, 0,2 nM, 0,3 nM, 0,4 nM, 0,5 nM, 0,6 nM, 0,7 nM, 0,8 nM, 0,9 nM, 1 nM, 2 nM, 3 nM, 4 nM, 5 nM, 6 nM, 7 nM, 8 nM, 9 nM, 10 nM, 11 nM, 12 nM, 13 nM, 14 nM, 15 nM, 16 nM, 17 nM, 18 nM, 19 nM, 20 nM, 21 nM, 22 nM, 23 nM, 24 nM, 25 nM, 26 nM, 27 nM, 28 nM, 29 nM, 30 nM, 31 nM, 32 nM, 33 nM, 34 nM, 35 nM, 36 nM, 37 nM, 38 nM, 39 nM, 40 nM, 41 nM, 42 nM, 43 nM, 44 nM, 45 nM, 46 nM, 47 nM, 48 nM, 49 nM, 50 nM, 51 nM, 52 nM, 53 nM, 54 nM, 55 nM, 56 nM, 57 nM, 58 nM, 59 nM, 60 nM, 61 nM, 62 nM, 63 nM, 64 nM, 65 nM, 66 nM, 67 nM, 68 nM, 69 nM, 70 nM, 71 nM, 72 nM, 73 nM, 74 nM, 75 nM, 76 nM, 77 nM, 78 nM, 79 nM, 80 nM, 81 nM, 82 nM, 83 nM, 84 nM, 85 nM, 86 nM, 87 nM, 88 nM, 89 nM, 90 nM, 91 nM, 92 nM, 93 nM, 94 nM, 95 nM, 96 nM, 97 nM, 98 nM, 99 nM, 100 nM, 101 nM, 102 nM, 103 nM, 104 nM, 105 nM, 106 nM, 107 nM, 108 nM, 109 nM, 110 nM, 111 nM, 112 nM, 113 nM, 114 nM, 115 nM, 116 nM, 117 nM, 118 nM, 119 nM, 120 nM, 121 nM, 122 nM, 123 nM, 124 nM, 125 nM, 126 nM, 127 nM, 128 nM, 129 nM, 130 nM, 131 nM, 132 nM, 133 nM, 134 nM, 135 nM, 136 nM, 137 nM, 138 nM, 139 nM, 140 nM, 141 nM, 142 nM, 143 nM, 144 nM, 145 nM, 146 nM, 147 nM, 148 nM, 149 nM, 150 nM, 151 nM, 152 nM, 153 nM, 154 nM, 155 nM, 156 nM, 157 nM, 158 nM, 159 nM, 160 nM, 161 nM, 162 nM, 163 nM, 164 nM, 165 nM, 166 nM, 167 nM, 168 nM, 169 nM, 170 nM, 171 nM, 172 nM, 173 nM, 174 nM, 175 nM, 176 nM, 177 nM, 178 nM, 179 nM, 180 nM, 181 nM, 182 nM, 183 nM, 184 nM, 185 nM, 186 nM, 187 nM, 188 nM, 189 nM, 190 nM, 191 nM, 192 nM, 193 nM, 194 nM, 195 nM, 196 nM, 197 nM, 198 nM, 199 nM, 200 nM, 201 nM, 202 nM, 203 nM, 204 nM, 205 nM, 206 nM, 207 nM, 208 nM, 209 nM, 210 nM, 211 nM, 212 nM, 213 nM, 214 nM, 215 nM, 216 nM, 217 nM, 218 nM, 219 nM, 220 nM, 221 nM, 222 nM, 223 nM, 224 nM, 225 nM, 226 nM, 227 nM, 228 nM, 229 nM, 230 nM, 231 nM, 232 nM, 233 nM, 234 nM, 235 nM, 236 nM, 237 nM, 238 nM, 239 nM, 240 nM, 241 nM, 242 nM, 243 nM, 244 nM, 245 nM, 246 nM, 247 nM, 248 nM, 249 nM, 250 nM, 251 nM, 252 nM, 253 nM, 254 nM, 255 nM, 256 nM, 257 nM, 258 nM, 259 nM, 260 nM, 261 nM, 262 nM, 263 nM, 264 nM, 265 nM, 266 nM, 267 nM, 268 nM, 269 nM, 270 nM, 271 nM, 272 nM, 273 nM, 274 nM, 275 nM, 276 nM, 277 nM, 278 nM, 279 nM, 280 nM, 281 nM, 282 nM, 283 nM, 284 nM, 285 nM, 286 nM, 287 nM, 288 nM, 289 nM, 290 nM, 291 nM, 292 nM, 293 nM, 294 nM, 295 nM, 296 nM, 297 nM, 298 nM, 299 nM, 300 nM, 301 nM, 302 nM, 303 nM, 304 nM, 305 nM, 306 nM, 307 nM, 308 nM, 309 nM, 310 nM, 311 nM, 312 nM, 313 nM, 314 nM, 315 nM, 316 nM, 317 nM, 318 nM, 319 nM, 320 nM, 321 nM, 322 nM, 323 nM, 324 nM, 325 nM, 326 nM, 327 nM, 328 nM, 329 nM, 330 nM, 331 nM, 332 nM, 333 nM, 334 nM, 335 nM, 336 nM, 337 nM, 338 nM, 339 nM, 340 nM, 341 nM, 342 nM, 343 nM, 344 nM, 345 nM, 346 nM, 347 nM, 348 nM, 349 nM, 350 nM, 351 nM, 352 nM, 353 nM, 354 nM, 355 nM, 356 nM, 357 nM, 358 nM, 359 nM, 360 nM, 361 nM, 362 nM, 363 nM, 364 nM, 365 nM, 366 nM, 367 nM, 368 nM, 369 nM, 370 nM, 371 nM, 372 nM, 373 nM, 374 nM, 375 nM, 376 nM, 377 nM, 378 nM, 379 nM, 380 nM, 381 nM, 382 nM, 383 nM, 384 nM, 385 nM, 386 nM, 387 nM, 388 nM, 389 nM, 390 nM, 391 nM, 392 nM, 393 nM, 394 nM, 395 nM, 396 nM, 397 nM, 398 nM, 399 nM, 400 nM, 401 nM, 402 nM, 403 nM, 404 nM, 405 nM, 406 nM, 407 nM, 408 nM, 409 nM, 410 nM, 411 nM, 412 nM, 413 nM, 414 nM, 415 nM, 416 nM, 417 nM, 418 nM, 419 nM, 420 nM, 421 nM, 422 nM, 423 nM, 424 nM, 425 nM, 426 nM, 427 nM, 428 nM, 429 nM, 430 nM, 431 nM, 432 nM, 433 nM, 434 nM, 435 nM, 436 nM, 437 nM, 438 nM, 439 nM, 440 nM, 441 nM, 442 nM, 443 nM, 444 nM, 445 nM, 446 nM, 447 nM, 448 nM, 449 nM, 450 nM, 451 nM, 452 nM, 453 nM, 454 nM, 455 nM, 456 nM, 457 nM, 458 nM, 459 nM, 460 nM, 461 nM, 462 nM, 463 nM, 464 nM, 465 nM, 466 nM, 467 nM, 468 nM, 469 nM, 470 nM, 471 nM, 472 nM, 473 nM, 474 nM, 475 nM, 476 nM, 477 nM, 478 nM, 479 nM, 480 nM, 481 nM, 482 nM, 483 nM, 484 nM, 485 nM, 486 nM, 487 nM, 488 nM, 489 nM, 490 nM, 491 nM, 492 nM, 493 nM, 494 nM, 495 nM, 496 nM, 497 nM, 498 nM, 499 nM, 500 nM, 501 nM, 502 nM, 503 nM, 504 nM, 505 nM, 506 nM, 507 nM, 508 nM, 509 nM, 510 nM, 511 nM, 512 nM, 513 nM, 514 nM, 515 nM, 516 nM, 517 nM, 518 nM, 519 nM, 520 nM, 521 nM, 522 nM, 523 nM, 524 nM, 525 nM, 526 nM, 527 nM, 528 nM, 529 nM, 530 nM, 531 nM, 532 nM, 533 nM, 534 nM, 535 nM, 536 nM, 537 nM, 538 nM, 539 nM, 540 nM, 541 nM, 542 nM, 543 nM, 544 nM, 545 nM, 546 nM, 547 nM, 548 nM, 549 nM, 550 nM, 551 nM, 552 nM, 553 nM, 554 nM, 555 nM, 556 nM, 557 nM, 558 nM, 559 nM, 560 nM, 561 nM, 562 nM, 563 nM, 564 nM, 565 nM, 566 nM, 567 nM, 568 nM, 569 nM, 570 nM, 571 nM, 572 nM, 573 nM, 574 nM, 575 nM, 576 nM, 577 nM, 578 nM, 579 nM, 580 nM, 581 nM, 582 nM, 583 nM, 584 nM, 585 nM, 586 nM, 587 nM, 588 nM, 589 nM, 590 nM, 591 nM, 592 nM, 593 nM, 594 nM, 595 nM, 596 nM, 597 nM, 598 nM, 599 nM, 600 nM, 601 nM, 602 nM, 603 nM, 604 nM, 605 nM, 606 nM, 607 nM, 608 nM, 609 nM, 610 nM, 611 nM, 612 nM, 613 nM, 614 nM, 615 nM, 616 nM, 617 nM, 618 nM, 619 nM, 620 nM, 621 nM, 622 nM, 623 nM, 624 nM, 625



90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, o aproximadamente. 700 µg/ml o más de un complejo péptido-polinucleótido de la invención. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica se formula para comprender 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o aproximadamente 100 µg/ml de un complejo péptido-polinucleótido de la invención. En otras realizaciones, una composición farmacéutica se formula para comprender 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, o aproximadamente 300 µg/ml de un complejo péptido-polinucleótido de la invención. En algunas otras realizaciones, una composición farmacéutica se formula para comprender 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, o aproximadamente 500 µg/ml de un complejo péptido-polinucleótido de la invención. En algunas otras realizaciones, una composición farmacéutica se formula para comprender 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, o aproximadamente 700 µg/ml o más de un complejo péptido-polinucleótido de la invención.

### III. PROCEDIMIENTO DE USO

En otro aspecto, la invención abarca un procedimiento para utilizar un complejo péptido-polinucleótido de la invención para transfectar el polinucleótido en el citoplasma de una célula. En algunas realizaciones, la célula está *in vitro*. En otras realizaciones, la célula está *in vivo*. Por lo tanto, la presente invención también proporciona un procedimiento para utilizar un complejo péptido-polinucleótido de la invención para transfectar el polinucleótido en el citoplasma de una célula en un sujeto que lo necesite. En términos generales, un procedimiento de la invención comprende poner en contacto una célula con un complejo péptido-polinucleótido de la invención en condiciones adecuadas para la transfección de un polinucleótido. Las células y condiciones adecuadas se describen anteriormente en la **Sección I**. En realizaciones en las que la célula está *in vivo*, un procedimiento de la invención comprende normalmente administrar una composición farmacéutica que comprende un complejo péptido-polinucleótido de la invención a un sujeto que lo necesite. Las composiciones farmacéuticas adecuadas se describen en la **Sección II**.

En otro aspecto, la invención abarca un procedimiento para tratar una afección en un sujeto. El procedimiento comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un complejo péptido-polinucleótido. Un complejo péptido-polinucleótido de la invención es capaz de transfectar eficazmente, o suministrar, el polinucleótido del complejo de péptido-polinucleótido en una célula del sujeto.

En algunas realizaciones, un polinucleótido de un complejo de la invención comprende ARN no codificante capaz de regular o inhibir la expresión de una secuencia de ácido nucleico expresada en una célula. Mediante la transfección eficaz de un polinucleótido capaz de regular o inhibir la expresión de una secuencia de ácido nucleico expresada en una célula, se puede utilizar un procedimiento de la invención para tratar cualquier afección que pueda tratarse regulando o inhibiendo la expresión de una secuencia de ácido nucleico normalmente expresada en una celda. En algunas realizaciones preferidas, la invención abarca un procedimiento para administrar un complejo péptido-polinucleótido de la invención a un sujeto para tratar una afección mediada por NFκB seleccionada de un tumor y artritis en el sujeto. En otras realizaciones preferidas, la invención abarca un procedimiento para administrar a un sujeto un complejo péptido-polinucleótido de la invención para tratar la angiogénesis asociada con la expresión de STAT3 en el sujeto. En otras realizaciones preferidas, la invención abarca un procedimiento para administrar a un sujeto un complejo péptido-polinucleótido de la invención para inhibir la formación de células espumosas asociada con la desregulación de JNK2 en el sujeto.

En otras realizaciones, un polinucleótido de un complejo de la invención comprende ADN que codifica una proteína que es deficiente o está ausente en el sujeto. Los ejemplos no limitantes de enfermedades caracterizadas por una proteína deficiente o ausente en un sujeto incluyen enfermedades de las neuronas motoras inferiores, enfermedad de Pompe, trastornos de almacenamiento lisosomal y glioblastoma multiforme. En una realización preferente, un polinucleótido de un complejo de la invención comprende ADN que codifica una proteína que es deficiente o está ausente en un sujeto con una enfermedad de almacenamiento lisosomal. La terapia de reemplazo enzimático es particularmente adecuada para enfermedades de almacenamiento lisosomal, y un complejo péptido-polinucleótido de la invención puede utilizarse para transfectar un casete o vector de expresión que codifica una proteína que es deficiente o está ausente en un sujeto con una enfermedad de almacenamiento lisosomal en el citoplasma del sujeto. Los trastornos de almacenamiento lisosomal incluyen, pero no se limitan a, Deficiencia del activador/Gangliosidosis GM2, Alfa-manidosidosis, Aspartilglucosaminuria, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol, deficiencia crónica de hexosaminidasa A, cistinosis, enfermedad de Danon, enfermedad de Fabry, enfermedad de Farber, Fucosidosis, Galactosialidosis, enfermedad de Gaucher (Tipo I, tipo II, tipo III), Gangliosidosis GM1 (Infantil, Infantil Tardío/Juvenil, Adulto/ crónico), enfermedad de células I/Mucopolipidosis II, Enfermedad de almacenamiento de ácido siálico libre infantil/ISSD, deficiencia de hexosaminidasa A juvenil, enfermedad de Krabbe (aparición infantil, aparición tardía), Leucodistrofia metacromática, trastornos de las mucopolisacaridosis (polidistrofia pseudohurler/mucopolipidosis IIIA, Síndrome de MPSI Hurler, Síndrome de MPSI Scheie, Síndrome de MPS I Hurler-Scheie, Síndrome de MPS I Hurler, Síndrome de Sanfilippo Tipo A/MPS III A, Síndrome de Sanfilippo Tipo B/MPS III B, Síndrome de Sanfilippo Tipo C/MPS III C, Síndrome de Sanfilippo Tipo D/MPS III D, Morquio Tipo A/MPS IVA, Morquio Tipo B/MPS IVB, Deficiencia de Hialuronidasa MPS IX, MPS VI Maroteaux-Lamy, Síndrome de MPS VII Sly, Mucopolipidosis I/Sialidosis, Mucopolipidosis IIIC, Mucopolipidosis tipo IV), Deficiencia múltiple de sulfatasa, Enfermedad de Niemann-Pick (tipo A, tipo B, tipo C), Lipofuscinosis Ceroides Neuronales (enfermedad CLN6 (infantil tardía atípica,

variante de inicio tardío, juvenil temprano), enfermedad Batten-Spielmeyer-Vogt/juvenil NCL/CLN3, variante finlandesa infantil tardía CLN5, enfermedad de Jansky-Bielschowsky/Enfermedad de CLN2/TPP1 infantil tardía, enfermedad de NCL/CLN4 de inicio en Kufs/adulto, epilepsia del Norte/variante infantil tardía CLN8, enfermedad de Santavuori-Haltia/CLN1/PPT infantil, Beta-manidosidosis, Enfermedad de Pompe/enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo II, Picnodisostosis, Enfermedad de Sandhoff/aparición en adulto/Gangliosidosis GM2, enfermedad de Sandhoff/gangliosidosis GM2-Infantil, enfermedad de Sandhoff/gangliosidosis GM2-juvenil, enfermedad de Schindler, enfermedad de Salla/Enfermedad por almacenamiento de ácido siálico, Gangliosidosis Tay-Sachs/GM2, enfermedad de Wolman. En una realización ejemplar, el sujeto requiere tratamiento para una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en la enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, MPS I, MPS II] MPS VI y enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II.

El péptido, el polinucleótido y el complejo péptido-polinucleótido pueden ser como se describe en la **Sección I**. Las composiciones farmacéuticas que comprenden un complejo péptido-polinucleótido de la invención pueden ser como se describe en la **Sección II**. Los procedimientos para administrar un complejo péptido-polinucleótido de la invención y los procedimientos para tratar una afección se describen a continuación.

#### 15 **(a) Administración a un sujeto que lo necesite**

En un aspecto, la presente invención abarca la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica a un sujeto que la necesite. Como se utiliza en el presente documento, la frase "un sujeto que lo necesite" se refiere a un sujeto que necesita tratamiento preventivo o terapéutico. Un sujeto puede ser un roedor, un ser humano, un animal de ganado, un animal de compañía o un animal de zoológico. En una realización, un sujeto puede ser un roedor, por ejemplo, un ratón, una rata, un conejillo de indias, etc. En otra realización, un sujeto puede ser un animal de ganado. Los ejemplos no limitantes de animales de ganado adecuados pueden incluir cerdos, vacas, caballos, cabras, ovejas, llamas y alpacas. En aún otra realización, un sujeto puede ser un animal de compañía. Los ejemplos no limitantes de animales de compañía pueden incluir mascotas como perros, gatos, conejos y pájaros. En aún otra realización, un sujeto puede ser un animal de zoológico. Como se utiliza en el presente documento, un "animal de zoológico" se refiere a un animal que se puede encontrar en un zoológico. Tales animales pueden incluir primates no humanos, gatos grandes, lobos y osos. En una realización preferente, un sujeto es un ratón. En otra realización preferida, un sujeto es un ser humano.

Como se describe en la **Sección II**, una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su ruta de administración prevista. Las rutas de administración adecuadas incluyen administración parenteral, oral, pulmonar, transdérmica, transmucosa y rectal. En realizaciones preferidas, una composición farmacéutica de la invención se administra mediante inyección.

Un experto en la materia reconocerá que la cantidad y la concentración de la composición administrada a un sujeto dependerán en parte del sujeto y del motivo de la administración. Los procedimientos para determinar las cantidades óptimas son conocidos en la materia. En general, la concentración de un complejo péptido-polinucleótido de la invención en una composición farmacéutica puede ser como se describe en la **Sección II**.

Las composiciones de la invención se administran normalmente a un sujeto que lo necesita en una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio al sujeto. Esta cantidad se define como una "cantidad terapéuticamente eficaz". Una cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse por la eficacia o potencia de la composición particular, el trastorno que se está tratando, la duración o frecuencia de la administración, el procedimiento de administración y el tamaño y condición del sujeto, incluida la respuesta al tratamiento particular de ese sujeto. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse utilizando procedimientos conocidos en la materia, y puede determinarse experimentalmente, derivándose de cantidades terapéuticamente eficaces determinadas en animales modelo tales como el ratón, o una combinación de los mismos. De manera adicional, la ruta de administración puede considerarse cuando se determina la cantidad terapéuticamente eficaz. Al determinar las cantidades terapéuticamente eficaces, un experto en la materia también puede considerar la existencia, naturaleza y alcance de cualquier efecto adverso que acompañe la administración de un compuesto particular en un sujeto particular.

Cuando una composición farmacéutica de la invención se administra a un sujeto por inyección, puede administrarse una composición al sujeto en un bolo en una cantidad de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 60, 70, 80, 90, o aproximadamente 100 mg/kg o más. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de la invención se administra a un sujeto en una cantidad de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, o aproximadamente 5 mg/kg. En otras realizaciones, una composición farmacéutica de la invención se administra a un sujeto en una cantidad de aproximadamente 5, 5,5, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, o aproximadamente 15 mg/kg. En algunas otras realizaciones, una composición farmacéutica de la invención se administra a un sujeto en una cantidad de aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o aproximadamente 30 mg/kg. En otras realizaciones, una composición farmacéutica de la invención se administra a un sujeto en una cantidad de aproximadamente 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o aproximadamente 45 mg/kg. En realizaciones adicionales, una composición farmacéutica de la invención se administra a un sujeto en una cantidad de aproximadamente 45, 46, 47, 48, 49, 50,

60, 70, 80, 90, o aproximadamente 100 mg/kg o más. En realizaciones preferidas, una composición se administra al sujeto en un bolo en una cantidad de aproximadamente 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 o aproximadamente 1,5 mg/kg.

5 También puede administrarse una composición mediante inyección de más de un bolo en el sujeto durante un período de tiempo. Por ejemplo, una composición puede administrarse mediante inyección de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más bolos en el sujeto. En algunas realizaciones, una composición se administra mediante inyección de 1, 2, 3, 4 o 5 bolos en el sujeto. En otras realizaciones, una composición se administra mediante inyección de 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más bolos en el sujeto. En realizaciones preferidas, una composición se administra mediante inyección de 2, 3 o 4 bolos en el sujeto. Los bolos pueden inyectarse aproximadamente cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o  
10 aproximadamente cada 12 horas, o pueden inyectarse aproximadamente cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, o aproximadamente cada 7 días. En realizaciones preferidas, los bolos pueden inyectarse aproximadamente cada día.

**(b) Tratamiento de una afección mediada por NFκB**

15 Como se ha descrito anteriormente, un procedimiento de la invención puede utilizarse para tratar una afección mediada por NFκB en un sujeto. Un procedimiento de la invención puede utilizarse para tratar una afección mediada por NFκB en un sujeto mediante la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico normalmente asociada con una ruta de señalización de NFκB. Un procedimiento de la invención puede utilizarse para tratar una afección mediada por NFκB en un sujeto mediante la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico normalmente asociada con la ruta de señalización de NFκB canónica, la ruta de señalización de NFκB no canónica, o tanto la ruta de señalización de NFκB canónica como no canónica. Como se describe en los ejemplos, los  
20 solicitantes sorprendentemente descubrieron que la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico normalmente asociada con la ruta de señalización de NFκB canónica y la ruta de señalización de NFκB no canónica es sinérgica. El término "sinérgico" se refiere a un efecto en el que dos o más agentes trabajan en sinergia para producir un efecto que es más aditivo que los efectos de cada agente de forma independiente. Una medida del sinergismo puede mostrarse mediante el procedimiento de índice de combinación de Chou-Talalay. El procedimiento de índice de Chou-Talalay se basa en la ecuación del efecto de la mediana y procede del principio de la ley de acción en masa, que es la teoría que vincula entidades únicas y múltiples, y dinámicas de primer orden y de orden superior, que abarcan las ecuaciones de Michaelis-Menten, Hill, Henderson-Hasselbalch y Scatchard. El  
25 procedimiento de índice de combinación de Chou-Talalay proporciona un índice de combinación (IC) en el que un efecto aditivo da un IC = 1, el sinergismo da un IC < 1 y el antagonismo da un IC > 1. Véase Ting-Chao Chou, 2008, Preclinical versus clinical drug combination studies, Leukemia & Lymphoma, 49:2059-2080.

30 En algunas realizaciones, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar una afección mediada por NFκB en un sujeto mediante la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico normalmente asociada con la ruta de señalización de NFκB canónica. En una alternativa ejemplar de las realizaciones, una afección mediada por NFκB en un sujeto se trata mediante la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica la subunidad p65 del factor de transcripción de la ruta de señalización de NFκB canónica.  
35

En otras realizaciones, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar una afección mediada por NFκB en un sujeto mediante la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico normalmente asociada con la ruta de señalización de NFκB no canónica. En una alternativa ejemplar de las realizaciones, una afección mediada por NFκB en un sujeto se trata mediante la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica la subunidad p100/p52 de la ruta de señalización de NFκB canónica.  
40

En realizaciones preferidas, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar una afección mediada por NFκB en un sujeto mediante la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico normalmente asociada con la ruta de señalización de NFκB canónica, y una secuencia de ácido nucleico normalmente asociada con la ruta de señalización de NFκB no canónica. En una alternativa ejemplar de las realizaciones, una afección mediada por NFκB en un sujeto se trata mediante la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica la subunidad p65 del factor de transcripción de la ruta de señalización de NFκB canónica y la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica la subunidad p100/p52 de la ruta de señalización de NFκB canónica.  
45

La expresión "afección mediada por NFκB" puede utilizarse para describir cualquier afección que pueda ser causada por la desregulación de la señalización en una ruta de señalización de NFκB. Los ejemplos no limitantes de afecciones mediadas por NFκB pueden incluir un trastorno de inflamación, una enfermedad autoinmune, rechazo de trasplantes, osteoporosis, cáncer, artritis, enfermedad del Alzheimer, artritis, aterosclerosis, una infección viral o ataxia telangiectasia. En algunas realizaciones, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar un trastorno de inflamación. En otras realizaciones, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar una enfermedad autoinmune. En algunas otras realizaciones, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar rechazo de trasplantes. En otras realizaciones, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar osteoporosis. En realizaciones adicionales, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar la enfermedad del Alzheimer. En otras realizaciones, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar aterosclerosis. En algunas otras realizaciones, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar una infección viral. En aún otras realizaciones, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar ataxia telangiectasia.  
50  
55  
60

*i. Tratamiento del cáncer*

En realizaciones preferidas, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar una neoplasia o cáncer. La neoplasia puede ser maligna o benigna, el cáncer puede ser primario o metastásico; la neoplasia o el cáncer pueden estar en etapa temprana o en etapa tardía. Un cáncer o una neoplasia pueden tratarse mediante el suministro de una secuencia de ácido nucleico a un tumor de cáncer en un sujeto. El cáncer o la neoplasia pueden tratarse mediante la reducción del crecimiento de las células cancerosas o matando las células cancerosas.

En algunas realizaciones, un polinucleótido de un complejo péptido-polinucleótido de la invención puede tratar un cáncer o una neoplasia mediante el suministro de un polinucleótido de la nanopartícula a una célula cancerosa en un sujeto *in vivo*. Los ejemplos no limitantes de neoplasias o cánceres que pueden tratarse con un procedimiento de la invención pueden incluir leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con el SIDA, linfoma relacionado con el SIDA, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitomas (cerebelosos o cerebrales infantiles), carcinoma de células basales, cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, glioma del tronco encefálico, tumores cerebrales (astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, ruta visual y gliomas hipotalámicos), cáncer de mama, adenomas/carcinoides bronquiales, Linfoma de Burkitt, tumores carcinoides (infantiles, gastrointestinales), carcinoma de origen primario desconocido, linfoma del sistema nervioso central (primario), astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, cáncer de cuello de útero, cánceres infantiles, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, linfomas cutáneos de linfocitos T, tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing en la familia de tumores de Ewing, tumor extracraneal de células germinales (infantil), tumor extragonadal de células germinales, cáncer de conducto biliar extrahepático, cánceres de ojo (melanoma intraocular, retinoblastoma), cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinóide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal, tumores de células germinales (extracraneales, extragonadal, ovárico infantiles), tumor trofoblástico gestacional, gliomas (adultos, tronco cerebral infantil, astrocitoma cerebral infantil, ruta visual infantil e hipotalámico), carcinóide gástrico, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado), linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, glioma de la ruta hipotalámica y visual (infantil), melanoma intraocular, carcinoma de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (cáncer de células renales), cáncer de laringe, leucemias (linfoblásticas agudas, mieloide aguda, linfocítica crónica, mielógena crónica, células pilosas), cáncer de labio y cavidad oral, cáncer de hígado (primario), cánceres de pulmón (células no pequeñas, células pequeñas), linfomas (relacionados con el SIDA, Burkitt, cutáneos de linfocitos T, Hodgkin, non Hodgkin, sistema nervioso central primario), macroglobulinemia (Waldenström), histiocitoma fibroso maligno de hueso/osteosarcoma, meduloblastoma (infantil), melanoma, melanoma intraocular, carcinoma de células de Merkel, mesoteliomas (adultos malignos, infantil), cáncer escamoso metastásico de cuello con origen primario oculto, cáncer de boca, síndrome de neoplasia endocrina múltiple (infantil), mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena (crónica), leucemias mieloides (agudas en adultos, agudas en la infancia), mieloma múltiple, trastornos mieloproliferativos (crónicos), cavidad nasal y cáncer de seno paranasal, carcinoma nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer oral, cáncer de orofaringe, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso, cáncer de ovario, cáncer epitelial de ovario (tumor de superficie epitelial-estromal), tumor de células germinales de ovario, tumor de ovario bajo de potencial maligno, cáncer de páncreas, cáncer de páncreas (célula de islote), cáncer de seno paranasal y cavidad nasal, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer de faringe, feocromocitoma, astrocitoma pineal, germinoma pineal, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales (infantiles), adenoma pituitario, neoplasia de células plasmáticas, blastoma pleuropulmonar, linfoma del sistema nervioso central primario, cáncer de próstata, cáncer rectal, carcinoma de células renales (cáncer de riñón), cáncer de células transicionales de pelvis renal y uréter, retinoblastoma, rabdomiosarcoma (infantil), cáncer de glándula salival, sarcoma (familia de tumores de Ewing, Kaposi, tejido blando, uterino), síndrome de Sézary, cánceres de piel (no melanoma, melanoma), carcinoma de piel (células de Merkel), cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer de cuello escamoso con origen primario oculto (metastásico), cáncer de estómago, tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial (infantil), linfoma de linfocitos T (cutáneo), leucemia y linfoma de linfocitos T, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma (infantil), timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de tiroides (infantil), cáncer de células de transición de la pelvis renal y el uréter, tumor trofoblástico (gestacional), sitio primario desconocido (adulto, infantil), cáncer de células transicionales uréter y pelvis renal, cáncer de uretra, cáncer uterino (endometrial), sarcoma uterino, cáncer vaginal, ruta visual y glioma hipotalámico (infantil), cáncer vulvar, macroglobulinemia de Waldenström y tumor de Wilms (infantil). En una realización preferente, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar linfoma y leucemia de linfocitos T. En una realización de ejemplo, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar la leucemia/linfoma de linfocitos T adultas (ATLL, de sus siglas en inglés) inducida por el Virus-1 Linfotrópico T humano (HTLV-1, de sus siglas en inglés).

En otras realizaciones, un polinucleótido de un complejo péptido-polinucleótido de la invención puede suministrarse a una célula cancerosa *in vitro*. Por ejemplo, un polinucleótido de un complejo péptido-polinucleótido de la invención puede suministrarse a una línea celular de cáncer *in vitro*. Una célula cancerosa puede ser una línea celular de cáncer cultivada *in vitro*. En algunas alternativas de las realizaciones, una línea celular de cáncer puede ser una línea celular primaria que aún no está descrita. Los procedimientos para preparar una línea celular de cáncer

primaria utilizan técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia. En otras alternativas, una línea celular de cáncer puede ser una línea celular de cáncer establecida. Una línea celular de cáncer puede ser adherente o no adherente, o una línea celular puede crecer en condiciones que estimulen el crecimiento adherente, no adherente u organotípico utilizando técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia. Una línea celular de cáncer puede estar inhibida por contacto o no inhibida por contacto.

En algunas realizaciones, la línea celular de cáncer puede ser una línea celular humana establecida procedente de un tumor. Los ejemplos no limitantes de líneas celulares de cáncer procedentes de un tumor pueden incluir las líneas celulares de osteosarcoma 143B, CAL-72, G-292, HOS, KHOS, MG-63, Saos-2 y U-2 OS; las líneas celulares de cáncer de próstata DU145, PC3 y Lncap; las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-438 y T47D; la línea celular de leucemia mieloide THP-1, la línea celular de glioblastoma U87; la línea celular de neuroblastoma SHSY5Y; la línea celular de cáncer de hueso Saos-2; las líneas celulares de cáncer de colon WiDr, COLO 320DM, HT29, DLD-1, COLO 205, COLO 201, HCT-15, SW620, LoVo, SW403, SW1116, SW1463, SW837, SW948, SW1417, GPC-16, HCT-8HCT 116, NCI-H716, NCI-H747, NCI-H508, NCI-H498, COLO 320HSR, SNU-C2A, LS 180, LS 174T, MOLT-4, LS513, LS1034, LS411N, Hs 675.T, CO 88BV59-1, Co88BV59H21-2, Co88BV59H21-2V67-66, 1116-NS-19-9, TA 99, AS 33, TS 106, Caco-2, HT-29, SK-CO-1, SNU-C2B y SW480; B16-F10, RAW264.7, la línea celular F8 y la línea celular de carcinoma pancreático Panc1. En una realización de ejemplo, un complejo péptido-polinucleótido de la invención puede administrarse a una línea celular F8. En otra realización ejemplar, un complejo péptido-polinucleótido de la invención puede administrarse a una línea celular B16-F10.

#### *ii. Tratamiento de una afección artrítica*

En otras realizaciones preferidas, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar una afección artrítica. Los ejemplos no limitantes de afecciones artríticas incluyen osteoartritis, artritis reumatoide, gota y pseudogota, artritis séptica, espondilitis anquilosante, artritis idiopática juvenil, enfermedad de Still, lupus o artritis causada por una infección o tratamiento. En algunas realizaciones, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar osteoartritis. En otras realizaciones, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar artritis reumatoide. En aún otras realizaciones, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar gota. En otras realizaciones, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar pseudogota. En realizaciones adicionales, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar artritis séptica. En otras realizaciones, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar espondilitis anquilosante. En aún otras realizaciones, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar artritis idiopática juvenil. En otras realizaciones, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar la enfermedad de Still. En realizaciones adicionales, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar lupus. En aún otras realizaciones, un procedimiento de la invención se utiliza para tratar artritis causada por una infección o tratamiento. Por ejemplo, un procedimiento de la invención puede utilizarse para tratar artritis causada por artritis inducida por anticuerpos de colágeno.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "tratar una afección artrítica" puede utilizarse para describir el alivio de los síntomas artríticos. Los ejemplos no limitantes de síntomas artríticos, independientemente del tipo de artritis, incluyen varios niveles de dolor, hinchazón, rigidez de la articulación, incapacidad para utilizar la mano o caminar, malestar y sensación de cansancio, pérdida de peso, dormir mal, molestias y dolores musculares, sensibilidad y dificultad para mover la articulación. Los procedimientos para medir los síntomas artríticos son bien conocidos en la materia y pueden incluir medir el grosor de una articulación artrítica como el tobillo, utilizando una puntuación artrítica o utilizando mediciones basadas en imágenes.

En algunas realizaciones, los síntomas artríticos se miden mediante el grosor del tobillo. Como tal, tratar una afección artrítica que utiliza un procedimiento de la invención puede prevenir un aumento en el grosor del tobillo en un sujeto tratado con una composición farmacéutica de la invención cuando se compara con un sujeto que no fue tratado con la composición farmacéutica.

En otras realizaciones, los síntomas artríticos se miden utilizando una puntuación artrítica. Los procedimientos para medir una puntuación artrítica son conocidos en la materia y pueden incluir la puntuación del Colegio Americano de Reumatología (ACR, de sus siglas en inglés), la escala de gravedad de la artritis reumatoide (RASS, de sus siglas en inglés), o los criterios de clasificación de la artritis reumatoide ACR/EULAR. Como tal, tratar una afección artrítica que utiliza un procedimiento de la invención puede prevenir un aumento en la puntuación artrítica en un sujeto tratado con una composición farmacéutica de la invención cuando se compara con un sujeto que no fue tratado con la composición farmacéutica. Por ejemplo, tratar una afección artrítica que utiliza un procedimiento de la invención puede prevenir un aumento en la puntuación artrítica por encima de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 utilizando los criterios de clasificación de artritis reumatoide ACR/EULAR. En realizaciones preferidas, tratar una afección artrítica que utiliza un procedimiento de la invención puede prevenir un aumento en la puntuación artrítica por encima de aproximadamente 1, 2 o aproximadamente 3.

En aún otras realizaciones, los síntomas artríticos se miden utilizando mediciones basadas en imágenes. Los procedimientos para medir síntomas artríticos utilizando mediciones basadas en imágenes son conocidos en la materia y pueden incluir la utilización de imágenes moleculares ultrasónicas como se describe en Hughes y col., 2011 J Acoust Soc Am. 129:3756; Hughes 2011 IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control. 58:2361-2369; Hughes y col., 2007 Ultrasound Med Biol. 33:1236-1243; Hughes y col., 2007 Journal of the Acoustical Society of

America. 121:3542-3557; Hughes y col., 2013 J Acoust Soc Am. 133:283-300; Hughes y col., 2009 Journal of the Acoustical Society of America. 126:2350-2358, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento en su totalidad.

**(c) Tratamiento de afecciones asociadas con la desregulación de STAT3**

5 En algunas realizaciones, la invención abarca un procedimiento para administrar a un sujeto un complejo péptido-polinucleótido de la invención para tratar una afección asociada con la desregulación de STAT3 en el sujeto. En algunas realizaciones preferidas, la invención se utiliza para tratar una afección asociada con la desregulación de STAT3 en un sujeto mediante la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3 en el sujeto. Por ejemplo, un procedimiento de la invención puede utilizarse para tratar el cáncer mediante la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3. Un cáncer o una neoplasia pueden ser como se describe en la **Sección III(c)i**. El cáncer o la neoplasia pueden tratarse mediante la reducción del crecimiento de las células cancerosas o mediante la prevención de la angiogénesis. En algunas realizaciones, el cáncer o la neoplasia se tratan mediante la reducción del crecimiento de las células cancerosas. En otras realizaciones, el cáncer o la neoplasia se tratan mediante la prevención de la angiogénesis. El término "angiogénesis" significa la formación de nuevos vasos sanguíneos en un tejido, la estimulación de la proliferación de células endoteliales o la promoción de la supervivencia de las células endoteliales en proliferación. En una realización preferente, la invención se utiliza para tratar cáncer en un sujeto mediante la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3 en el sujeto. En una realización de ejemplo, la invención se utiliza para tratar cáncer en un sujeto mediante la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3 en el sujeto mediante la reducción del crecimiento de células cancerosas. En otra realización ejemplar, la invención se utiliza para tratar cáncer en un sujeto mediante la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3 en el sujeto mediante la prevención de la angiogénesis.

La alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3 puede reducir el nivel de expresión de la proteína STAT3. La alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3 también puede reducir el nivel de un ARNm que codifica STAT3. Por ejemplo, la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3 puede reducir el nivel de un ARNm que codifica STAT3 en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o aproximadamente 10 veces o más. En algunas realizaciones, la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3 reduce el nivel de un ARNm que codifica STAT3 en aproximadamente 1, 2, 3, 4 o aproximadamente 5 veces. En otras realizaciones, la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3 reduce el nivel de un ARNm que codifica STAT3 en aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, o aproximadamente 10 veces o más.

En general, las curvas de titulación que miden la capacidad de una composición farmacéutica de la invención para alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico normalmente expresada en una célula pueden realizarse para determinar la  $CI_{50}$ . Por ejemplo, la  $CI_{50}$  de una composición farmacéutica que comprende un complejo péptido-polinucleótido capaz de alterar la expresión de STAT3 en una célula puede ser de aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 9, o aproximadamente 100 nM o más. En algunas realizaciones, la  $CI_{50}$  de una composición farmacéutica que comprende un complejo péptido-polinucleótido capaz de alterar la expresión de STAT3 en una célula es de aproximadamente 10, 15, 20, 25, o aproximadamente 30 nM. En otras realizaciones, la  $CI_{50}$  de una composición farmacéutica que comprende un complejo péptido-polinucleótido capaz de alterar la expresión de STAT3 en una célula es de aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, o aproximadamente 60 nM. En aún otras realizaciones, la  $CI_{50}$  de una composición farmacéutica que comprende un complejo péptido-polinucleótido capaz de alterar la expresión de STAT3 en una célula es de aproximadamente 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 9, o aproximadamente 100 nM o más. En realizaciones preferidas, la  $CI_{50}$  de una composición farmacéutica que comprende un complejo péptido-polinucleótido capaz de alterar la expresión de STAT3 en una célula es de aproximadamente 40, 45, 50, 55, o aproximadamente 70 nM.

La alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3 puede prevenir la angiogénesis. Los procedimientos para medir la angiogénesis son conocidos en la materia y pueden ser como se describen en los ejemplos y pueden incluir ensayos de formación de tubos de matrigel y ensayos de migración de células transwell. La alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3 puede reducir la formación de tubos de matrigel en aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, o aproximadamente 95 % o más. En algunas realizaciones, la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3 reduce la formación de tubos de matrigel en aproximadamente 30, 35, 40, 45, o aproximadamente 50 %. En otras realizaciones, la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3 reduce la formación de tubos de matrigel en aproximadamente 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, o aproximadamente el 95 % o más. En realizaciones preferidas, la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3 reduce la formación de tubos de matrigel en aproximadamente 50, 55, 60, 65, o aproximadamente 70 %.

**(d) Tratamiento de afecciones asociadas con la desregulación de JNK2**

En otras realizaciones, la invención abarca un procedimiento para administrar a un sujeto un complejo péptido-polinucleótido de la invención para tratar una afección asociada con la desregulación de JNK2 en el sujeto. En una

realización de ejemplo, la invención se utiliza para tratar una afección asociada con la desregulación de JNK2 en un sujeto mediante la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica JNK2 en el sujeto. Por ejemplo, un procedimiento de la invención puede utilizarse para tratar aterosclerosis mediante la alteración de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica JNK2. En algunas realizaciones preferidas, la aterosclerosis se trata mediante el bloqueo de la formación de células espumosas. La formación de células espumosas es el sello distintivo de las placas ateroscleróticas, y puede convertirse en un problema cuando se acumulan en focos particulares, que crean así un centro necrótico de aterosclerosis. En una realización de ejemplo, un complejo péptido-polinucleótido, en el que el polinucleótido del complejo es un ARNip anti-JNK2, se utiliza para bloquear la formación de células espumosas.

#### 10 **IV. KIT**

Otro aspecto de la divulgación abarca un kit. El kit comprende una primera composición que comprende un péptido y opcionalmente una segunda composición que comprende un polinucleótido. Como alternativa, un usuario del kit puede proporcionar un polinucleótido de interés. Siguiendo las indicaciones proporcionadas por el kit, un usuario del kit puede mezclar la composición que comprende un péptido y una composición que comprende un polinucleótido para formar un complejo péptido-polinucleótido. Las indicaciones del kit pueden incluir instrucciones para mezclar el péptido y el polinucleótido en una proporción adecuada. Las relaciones adecuadas se describen anteriormente en la Sección I. El kit también puede incluir tampones adecuados, agua, reactivos de reticulación o albúmina.

#### **Definiciones**

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a los polímeros de aminoácidos de origen natural, aquellos que contienen restos modificados, y polímero de aminoácidos de origen no natural.

Los términos "homólogo", "idéntico" o porcentaje de "identidad" en relación con dos o más péptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos que son iguales (es decir, aproximadamente un 60 % de identidad, preferentemente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o una identidad superior en una región específica, cuando se compara y se alinea para obtener una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación o una región designada) según lo medido utilizando un algoritmo de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con los parámetros predeterminados que se describen a continuación, o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, el sitio web de NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) o similar). La definición también incluye secuencias que tienen deleciones y/o adiciones, así como aquellas que tienen sustituciones, así como las de origen natural, por ejemplo, variantes polimórficas o alélicas, y variantes creadas por el hombre. Como se describe a continuación, los algoritmos preferidos pueden dar cuenta de vacíos y similares.

Los términos "aislado", "purificado" o "biológicamente puro" se refieren al material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan tal como se encuentra en su estado nativo. La pureza y la homogeneidad se determinan normalmente mediante técnicas de química analítica, como la electroforesis en gel de poli(acrilamida) o la cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína o ácido nucleico que es la especie predominante presente en una preparación se purifica sustancialmente. El término "purificado" en algunas realizaciones denota que un ácido nucleico o proteína da lugar a esencialmente una banda en un gel electroforético. Preferentemente, significa que el ácido nucleico o la proteína tiene una pureza de al menos el 85 %, más preferentemente una pureza de al menos el 95 %, y lo más preferentemente una pureza de al menos el 99 %. "Purificar" o "purificación" en otras realizaciones significa eliminar al menos un contaminante de la composición a purificar. En este sentido, la purificación no requiere que el compuesto purificado sea homogéneo, por ejemplo, 100 % puro.

#### **Ejemplos**

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la divulgación. Los expertos en la materia deberían apreciar que las técnicas desveladas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por los inventores para que funcionen bien en la práctica de la divulgación y, por lo tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la materia deberían, a la luz de la presente divulgación, apreciar que pueden realizarse muchos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan y seguir obteniendo un resultado sin apartarse de la invención que es como se define en las reivindicaciones.

#### **Introducción para los ejemplos 1-8**

Se ha propuesto el ARN de interferencia (ARNi) con la utilización del ARN de interferencia pequeño (ARNip) como una terapia altamente eficaz para innumerables enfermedades que incluyen cáncer y aterosclerosis. Sin embargo, a pesar de casi dos décadas de intensa investigación, la terapéutica de ARNip ha demostrado un éxito limitado en la traducción a aplicaciones clínicas. Las principales barreras que impiden el éxito de las terapias basadas en ARNip

comprenden una pobre absorción celular e inestabilidad del ARNip libre en suero. Su gran peso molecular (~ 14 kDa) y su alta carga superficial impiden que el ARNip pase a través de la membrana celular para alcanzar el compartimento citoplásmico donde el ARNip está activo, bloqueando así la inducción exitosa de ARNi. Estas características, combinados con una semivida sérica de solo -10 minutos, requieren el empaquetamiento del ARNip en agentes de transfección. Estos agentes pueden proteger el ARNip de las endonucleasas séricas y promover la absorción del ARNip a través de la endocitosis. Desafortunadamente, estas rutas endocíticas presentan otra barrera, ya que el ARNip debe evitar permanecer atrapado en el compartimento endosomal/lisosomal donde se degrada por un entorno cada vez más ácido.

A pesar de estos desafíos, se han utilizado con éxito lípidos y polímeros catiónicos para la transfección de ARNip. Desafortunadamente, estos tipos de agentes de transfección pueden exhibir una citotoxicidad inaceptable. La incorporación de lípidos catiónicos en las bicapas de membrana dentro de las células promueve la liberación de ARNip en el citoplasma, pero también causa la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la fuga de Ca +2, un efecto secundario compartido por los polímeros catiónicos de polietilenoilina de alto peso molecular. A pesar del desarrollo continuo de estos vehículos de ARNip para reducir la citotoxicidad, estos agentes han experimentado dificultades cuando se administran sistémicamente *in vivo* debido a la agregación con proteínas séricas y la activación del complemento. Si el problema del suministro sistémico de ARNip se debe resolver, se deberán desarrollar nuevas clases de agentes de transfección de ARNip.

Los agentes de transfección de ARNip basados en péptidos que penetran las células (CPP, de sus siglas en inglés) se han mostrado prometedores con respecto a la reducción de la citotoxicidad. Aunque la transfección de ARNip basada en CPP parece casi libre de citotoxicidad, los agentes de transfección basados en péptidos no han logrado la alta eficacia de los agentes de transfección lipídicos tradicionales. Los estudios de Veldhoen y col. (2006, Nucleic Acids Res. 34: 6561-73) han proporcionado información que sugiere que la transfección basada en péptidos está limitada por el atrapamiento lisosomal. A pesar de que los primeros trabajos sugieren que los CPP median la absorción de ARNip de una manera independiente de la energía, parece que las nanopartículas producidas por el ensamblaje de CPP y ARNip son endocitosas y deben escapar de la ruta endosomal-lisosomal para acceder al compartimento citosólico. Con esta barrera en mente, la tecnología de CPP existente ha logrado un nuevo nivel de sofisticación a través de la conjugación química de los CPP a los lípidos activos de membrana o agentes endosomolíticos, aunque estos aún requieren más procesamiento y purificación de péptidos.

Los ejemplos que se presentan a continuación proponen una estrategia alternativa para la transfección de ARNip basada en péptidos eficaz basada en modificaciones del péptido citolítico, la melitina, que es el componente formador de poros del veneno de abeja. La capacidad de la melitina para formar poros en las bicapas de membrana sugiere que puede servir como base para el desarrollo de péptidos simples que pueden mejorar el escape endosomal, estableciendo así el escenario para un suministro de ARNip más eficaz en el compartimento citosólico para un ARNi mejorado y superar la menor eficacia asociada con estrategias tradicionales basadas en CPP. El trabajo previo realizado por los inventores ha demostrado que la melitina puede modificarse para atenuar su citotoxicidad mientras mantiene su propensión a interactuar con las bicapas de membrana. Como se demuestra en los presentes ejemplos, mediante la incorporación de estos cambios junto con las modificaciones para mejorar las interacciones péptido/ARNip, los péptidos procedentes de la melitina pueden suministrar de forma segura el ARNip al compartimento citoplásmico debido a sus propiedades inherentes activas de membrana.

**Ejemplo 1. Detección de la atenuación de ARNip.**

La atenuación de las células B16 que expresan de forma estable GFP-PEST permitió una rápida detección de la atenuación eficaz del ARNip de la expresión de GFP debido a que la secuencia PEST acorta la semivida de GFP de 26 a 10 horas. Los derivados de la melitina se seleccionaron según las modificaciones diseñadas para disminuir la citotoxicidad así como mejorar las interacciones con oligonucleótidos. Estos péptidos se cribaron por su capacidad para suministrar ARNip de GFP para la atenuación de GFP en células B16 GFP (**Tabla 1, FIG. 1**). P5RHH exhibió una transfección de ARNip especialmente eficaz y se eligió para una caracterización y optimización adicionales de la formulación.

**Tabla 1:** La melitina junto con tres derivados se probaron para la atenuación de GFP a 50 nM. Solo p5RHH mostró un suministro significativo de ARNip.

	Composición de partículas (péptido/ARNip)	Relación de carga (+/-)	¿Capaz de transfectar?
Melitina (SEQ ID NO: 53) GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ	62:1	6:1	No
	124:1	12:1	Tóxico
	248:1	24:1	Tóxico
Péptido 5C (SEQ ID NO: 54) VLTGLPALISWIKRKRQQC	62:1	6:1	No
	124:1	12:1	No

	248:1	24:1	No
Péptido 5RWR (SEQ ID NO: 55) VLTTGLPALISWIKRKRQQRRRRR	28:1	6:1	No
	56:1	12:1	No
	112:1	24:1	No
Péptido 5RHH (SEQ ID NO: 1) VLTTGLPALISWIRRRHRRHC	50:1	6:1	Sí
	100:1	12:1	Sí
	200:1	24:1	Sí

La citometría de flujo se realizó para determinar la relación óptima p5RHH:ARNip para la transfección, en la que la eficacia de la transfección mejoró con el aumento del contenido de p5RHH hasta el máximo en una relación p5RHH:ARNip de 150:1 (**FIG. 1A**). En cambio, el ARNip aleatorio no tuvo efecto en los niveles de expresión de GFP en las mismas condiciones. Aunque no hubo signos de citotoxicidad asociada con el péptido en relaciones de hasta 200:1 (**FIG. 1B**), se seleccionó una relación p5RHH:ARNip de 100:1 para los experimentos restantes para minimizar la exposición al p5RHH.

**Ejemplo 2. Formación y caracterización de nanopartículas.**

Sobre la base de la carga positiva neta global del derivado de melitina, p5RHH, se anticipó que interactuaría electrostáticamente con el ARNip cargado negativamente. Estas interacciones se monitorizaron en diferentes relaciones péptido:ARNip utilizando ensayos de retardo de gel, en los que solo el ARNip libre unido podría migrar al gel de poliacrilamida en presencia de un campo eléctrico. En estos ensayos, se mezcló una cantidad fija de ARNip con cantidades crecientes de p5RHH en PBS durante 40 minutos antes de cargar en el gel (**FIG. 2A**). Es evidente que se requiere una relación péptido:ARNip de al menos 50:1 para compactar completamente el ARNip, lo que confirmó la falta de transfección de ARNip observada por FACS en relaciones de p5RHH:ARNip por debajo de 50:1 (**FIG. 1A**).

La dispersión dinámica de la luz (DLS, de sus siglas en inglés) y las mediciones del potencial zeta (**Tabla 2**) revelaron que el tamaño de partícula está estrechamente relacionado con la carga superficial eficaz. Las partículas que tienen una carga superficial cercana a 0 mV exhiben el mayor diámetro, mientras que las partículas con un potencial zeta de mayor magnitud tienen diámetros más pequeños. Se encontró que el tamaño de partícula más pequeño de 190 nm se producía con una relación molar péptido:ARNip de 100:1 o una relación de carga de alrededor de 12:1 (+/-). Es importante tener en cuenta que aumentar la relación p5RHH:ARNip a 200:1 (duplicando la relación +/- a 24:1) no aumenta el potencial zeta, pero da como resultado un aumento del tamaño de partícula. Este fenómeno se ha informado previamente con otros agentes de transfección de péptidos, aunque la causa aún no se ha establecido. La fractura por congelación SEM (**FIG. 2B**) muestra la presencia de distintas nanopartículas con un diámetro total cercano a 150 nm. De forma interesante, estas partículas parecen consistir en agregados de partículas más pequeñas, de 10-20 nm, que se han unido para formar una partícula estable de mayor diámetro. Cuando se evalúa el tamaño mediante microscopía de fuerza atómica (AFM, de sus siglas en inglés), el tamaño de partícula después de 72 horas es < 100 nm, normalmente alrededor de 50-100 nm. En general, parece que cuando el tamaño de partícula se evalúa mediante DLS, el tamaño de partícula puede parecer mayor porque los agregados están incluidos en la respuesta. El tamaño de las partículas activas, medido con mayor precisión mediante SEM o AFM, es alrededor de 50 a 100 nm.

**Tabla 2:** Características de las nanopartículas (NP) en varias relaciones péptido:ARNip. El análisis de las nanopartículas de p5RHH:ARNip mediante dispersión dinámica de la luz y el análisis del potencial zeta sugieren que la carga superficial eficaz determina el tamaño de partícula. Las nanopartículas con una carga superficial de mayor magnitud exhiben diámetros más pequeños, lo que sugiere la importancia de las interacciones electrostáticas en la estabilización de las nanopartículas de p5RHH:ARNip. Una relación p5RHH:ARNip de 100:1 genera el tamaño de partícula más pequeño de 190 nm.

Composición de partículas (ARNip/péptido)	Relación de carga (+/-)	Tamaño de partícula (nm)	Potencial zeta (mV)
10:1	1,2:1	299,6	-13
25:1	3:1	830,6	-2,28
50:1	6:1	603,6	3,72
100:1	12:1	187,9	12
200:1	24:1	315,5	13,1

**Ejemplo 3. Comparación con LF2000.**

El análisis de la respuesta a la dosis mediante citometría de flujo reveló que la atenuación de GFP por el ARNip de GFP transfectado con p5RHH es altamente eficaz, con una capacidad para disminuir la expresión de GFP en ~ 15 % de las células en concentraciones tan bajas como 5 nM (**FIG. 3A**). El ARNip aleatorio no tuvo ningún efecto sobre los niveles de proteína GFP cuando se transfectó en las mismas condiciones (**FIG. 3C, D**). Sin embargo, en comparación con Lipofectamine 2000, p5RHH es menos eficaz en la transfección de ARNip, con una  $CI_{50}$  de 50 nM basada en RT-PCR en comparación con la  $CI_{50}$  reportada de Lipofectamine 2000 de 10 nM (**FIG. 3E, F**). De manera adicional, la capacidad de p5RHH para transfectar ARNip a bajas concentraciones, como se observa en la citometría de flujo, no es evidente a través de transferencia de Western o RT-PCR, probablemente debido al bajo porcentaje de células (~ 15 %) que muestran una atenuación de FACS. Sin embargo, es evidente que p5RHH mejora drásticamente el perfil de citotoxicidad sobre lipofectamine 2000, que es evidente a partir de la disminución mínima (~ 3 %) en la viabilidad celular, incluso en las concentraciones más altas probadas (**FIG. 3B**).

**Ejemplo 4. Liberación eficaz de ARNip en el citoplasma.**

El análisis de un derivado de melitina que se sabe que está inactivo para la transfección de ARNip (p5RWR: VLTGGLPALISWIKRKRQQRWRRRR (SEQ ID NO: 83), **Tabla 1, FIG. 1**) por microscopía confocal revela que los oligonucleótidos empaquetados con p5RWR no llegan al citoplasma sin incubación en presencia de cloroquina 50  $\mu$ M, que es un agente endosomolítico conocido (**FIG. 4B, C**). El análisis de FACS para la atenuación de GFP confirma que el ARNip transfectado por p5RWR no es capaz de iniciar la atenuación de GFP sin la ayuda de la cloroquina (**FIG. 4A**). Estos datos sugieren que las nanopartículas de p5RWR/ARNip permanecen atrapadas en el compartimento endosomal y no pueden iniciar ARNi. En comparación, p5RHH solo es capaz de suministrar oligonucleótidos al citoplasma cuando se analiza 24 horas después de la transfección (**FIG. 4D, E**), lo que sugiere que p5RHH posee una capacidad endosomolítica innata.

**Ejemplo 5. Suministro de ARNip para retardar el crecimiento del cáncer.**

El transductor de señal y el activador de la transcripción 3 (STAT3, de sus siglas en inglés) es un oncogén bien conocido que se considera que desempeña un papel fundamental en una amplia variedad de malignidades humanas. Para probar la capacidad de p5RHH para regular negativamente los oncogenes activados de forma constitutiva, la expresión de STAT3 se dirigió a las células B16-F10 que se sabe que son dependientes de STAT3. El suministro de un ARNip específico de STAT3 condujo a la degradación del ARNm de STAT3 con una disminución subsiguiente en la expresión de la proteína STAT3 (p5RHH  $CI_{50}$ : ~ 50 nM, Lipofectamine 2000  $IC_{50}$ : ~ 10 nM) (**FIG. 5A-D, FIG. 6**). La transfección de ARNip de STAT3 mediada por p5RHH condujo a una disminución de la viabilidad de B16-F10 (60 % a 200 nM) 72 horas después de la transfección, según se determinó mediante los ensayos de Alamar Blue (**FIG. 5E**). Cabe destacar que, el ARNip aleatorio no mostró ningún efecto sobre la viabilidad de B16, lo que ilustra la seguridad de p5RHH en comparación con Lipofectamine 2000 (**FIG. 5F**), que produjo una disminución equivalente en la viabilidad celular (hasta un 60 % a 200 nM) cuando se administró ARNip específico de STAT3 o aleatorio.

**Ejemplo 6. Suministro de ARNip para prevenir la angiogénesis.**

La angiogénesis patológica es un sello distintivo de muchos estados patológicos, incluido el cáncer, la aterosclerosis y la inflamación. El STAT3 ha demostrado previamente ser un mediador clave en la migración y la maduración de las células endoteliales durante la angiogénesis. Por lo tanto, la capacidad de p5RHH para suministrar ARNip de STAT3 a células HUVEC para el bloqueo de la angiogénesis se delimitó con la utilización de ensayos de formación de tubos de matrigel y ensayos de migración de células transwell. Las HUVEC transfectadas con nanopartículas de ARNip p5RHH/STAT3 mostraron una disminución en los niveles de ARNm y proteínas de STAT3 con un  $CI_{50}$  de ~ 50 nM (**FIG. 7A, B, FIG. 8**) sin ningún tipo de disminución en la viabilidad de HUVEC (**FIG. 7C**). Al igual que con la transfección de células B16-F10, la transfección mediada por Lipofectamine 2000 exhibe una  $CI_{50}$  de ~ 10 nM, pero fuerte citotoxicidad, con una disminución del 40 % en la viabilidad celular en dosis de ARNip tan bajas como 25 nM (**FIG. 9**).

Aunque la transfección de ARNip de STAT3 mediada por p5RHH no afectó la viabilidad celular, las nanopartículas de ARNip p5RHH/STAT3 utilizadas para tratar HUVEC manifestaron una disminución de ~ 60 % en la formación de tubos en comparación con el ARNip aleatorio para el tratamiento de HUVEC (**FIG. 7D-F**). Además, la migración de HUVEC transfectadas por p5RHH se redujo en un 50 % según lo cuantificado por Alamar Blue (**FIG. 7I**) y microscopía de fluorescencia (**FIG. 7H, Fig. 10**). Estos datos demuestran la alta eficacia con la que p5RHH es capaz de transfectar de manera segura las células endoteliales humanas primarias para la prevención de la angiogénesis patológica.

**Ejemplo 7. Suministro de ARNip para disminuir la formación de células espumosas.**

Las barreras endoteliales rotas que caracterizan las placas ateroscleróticas hacen de la aterosclerosis un objetivo primordial para las terapias basadas en nanopartículas. Para asegurar que la formación de células espumosas, el sello distintivo de las placas ateroscleróticas, podría bloquearse con las nanopartículas de p5RHH/ARNip, el ARNip de JNK2 se administró a RAW264.7 (línea celular de monocitos/macrófagos de ratón). JNK2 es un conocido

mediador de la formación de células espumosas y se ha implicado en la absorción de Ac-LDL por parte del receptor eliminador A, así como de oxLDL por CD36. p5RHH fue capaz de suministrar ARNip de JNK2 a células RAW264.6 sin citotoxicidad (**FIG. 11A, B**), lo que llevó a una fuerte disminución en los niveles de proteína JNK2 en concentraciones tan bajas como 25 nM. En comparación, Lipofectamine 2000 tiene una  $CI_{50}$  similar a la determinada por transferencia de Western, pero también exhibe una extensa citotoxicidad (**FIG. 12**). La disminución de los niveles de proteína JNK2 suprimió la formación de células espumosas en las células RAW264.7 que se han incubado en presencia de 50  $\mu\text{g/ml}$  de Ac-LDL durante 12 horas según lo determinado por microscopía de luz después de la tinción con Oil-Red O (**FIG. 11C-E**). Estas imágenes muestran una extensa acumulación de gotas de lípidos en controles no tratados y células tratadas con ARNip aleatorio, pero no acumulación de gotas de lípidos en células RAW264.7 tratadas con un ARNip específico de JNK2.

#### Ejemplo 8. Rendimiento de p5RHH en presencia de suero.

Para garantizar que las partículas utilizadas en los experimentos sean estables en presencia de suero, se incubaron nanopartículas de p5RHH/ARNip en albúmina de suero humano (HSA, de sus siglas en inglés) 150  $\mu\text{g/ml}$  durante 12 horas o toda la noche. La dispersión dinámica de la luz reveló que el tamaño no cambió cuando se comparó con las partículas recién preparadas (**Tabla 3**). Además, el potencial zeta de las nanopartículas incubadas con HSA se volvió menos positivo, lo que podría deberse al recubrimiento de las nanopartículas con albúmina cargada negativamente. Cuando se probó la actividad de estas partículas, su capacidad para atenuar la expresión de GFP se mejoró de manera fortuita en comparación con las nanopartículas frescas (**FIG. 13A, B**). Estos experimentos demuestran la estabilidad del suero de las nanopartículas de p5RHH/ARNip, su maduración a agentes de transfección aún más potentes a lo largo del tiempo en ciertas condiciones, lo que sugiere una aplicabilidad potencial en entornos *in vivo*.

**Tabla 3.** Análisis del tamaño de partícula de p5RHH:ARNip incubado en presencia de albúmina sérica (población promedio de una formulación).

	Tamaño de partícula (nm)	Índice de polidispersidad	Potencial zeta (mV)
Péptido 5RHH/ARNip - HSA (30 min)	190	0,120	12,0 $\pm$ 0,7
Péptido 5RHH/ARNip - HSA (12 horas)	> 5.000	--	--
Péptido 5RHH/ARNip + HSA (30 min)	190	0,194	-7,0 $\pm$ 1,0
Péptido 5RHH/ARNip + HSA (12 horas)	220	0,191	-5,5 $\pm$ 1,5

#### Discusión para los ejemplos 1-8

Los solicitantes han explorado previamente procedimientos de suministro de ARNip altamente eficaces basados en lípidos catiónicos en una nueva formulación de nanoemulsión de perfluorocarbono. A pesar de la alta eficacia de la transfección lograda *in vitro*, las dificultades con la transfección a altas concentraciones de nanopartículas reflejaron los desafíos que acompañan a los agentes de transfección de lípidos catiónicos tradicionales. En los presentes ejemplos, los péptidos de melitina se modificaron para realizar un agente de transfección de ARNip de alta eficacia basado en la hipótesis de que la inserción de la membrana de melitina y la capacidad de formación de poros proporcionarían un medio novedoso de escape endosomal, que es un inconveniente clave para los agentes de transfección de ARNip basados en CPP informado anteriormente.

De hecho, los experimentos presentados en el presente documento demuestran que p5RHH es capaz de facilitar la liberación de ARNip en el citoplasma. El análisis de un derivado de melitina inactivo (p5RWR) sugiere que, al igual que con el suministro tradicional de ARNip basado en CPP, las partículas de p5RWR/ARNip también se incorporan a los endosomas y requieren agentes endosomolíticos para acceder al citoplasma. Las nanopartículas de P5RHH/ARNip tienen una carga superficial positiva determinada por las mediciones del potencial zeta, que es una característica que se ha demostrado que desempeña un papel importante en la asociación de nanopartículas con las membranas celulares y la posterior endocitosis. Sobre la base de la similitud de la carga superficial, es probable que las nanopartículas de p5RHH/ARNip se manejen a través de la misma maquinaria endocítica que los complejos inactivos p5RWR/ARNip, lo que sugiere que p5RHH puede promover la liberación de ARNip de la ruta endosomal/lisosomal de manera eficaz. Aunque la ruta de absorción exacta responsable de la internalización de la nanopartícula de p5RHH/ARNip queda por determinar, el análisis de los complejos inactivos p5RWR proporciona información sobre los mecanismos potenciales del procesamiento de nanopartículas de p5RHH/ARNip por la célula.

Si bien las propiedades exactas responsables del escape endosomal eficaz aún no se han aclarado, el trabajo sobre los péptidos histidilados utilizados para la transfección de oligonucleótidos proporciona cierta intuición con respecto a la función de p5RHH. Los péptidos y polímeros histidilados se diseñaron originalmente para ayudar a la liberación de plásmidos en función de la protonación del grupo imidazol de histidina ( $pK_a \sim 6,0$ ) durante la acidificación lisosomal

(pH ~ 4,5). Estos polímeros incorporan un alto contenido de histidina (80-90 % de histidina) para conducir la lisis endosomal a través del efecto de esponja de protones. p5RHH posee solo dos restos de histidina y, por lo tanto, es poco probable que sea capaz de tamponar suficientes protones para lisar endosomas. Sin embargo, la protonación de los restos de histidina probablemente promueve el desensamblaje de nanopartículas de p5RHH/ARNip y la liberación de p5RHH para permeabilizar la membrana endosomal para la liberación de ARNip. Actualmente se están llevando a cabo estudios detallados sobre el desensamblaje de p5RHH/ARNip y la capacidad lítica a pH bajo.

La capacidad de p5RHH para suministrar ARNip al citoplasma produce una disminución cuantificable en la expresión de GFP en concentraciones tan bajas como 5 nM. Sin embargo, p5RHH aún no es capaz de alcanzar el nivel de eficacia de transfección proporcionado por Lipofectamine 2000 en células B16-F10 o HUVEC. p5RHH parece exhibir una eficacia mejorada cuando se transfectan células RAW264.7, con una  $CI_{50}$  que es aproximadamente igual a la de Lipofectamine 2000. No es sorprendente que, los diferentes tipos de células favorezcan los diferentes mecanismos endocíticos que podrían explicar las diferencias entre las eficacias de transfección en diferentes tipos de células. Sin embargo, p5RHH exhibe una mejora sustancial sobre la transfección basada en lípidos catiónicos tradicional con respecto a la citotoxicidad, que muestra una disminución mínima en la viabilidad celular frente a una variedad de líneas celulares de ratón y humanas en todas las concentraciones probadas. Además, parece que la eficacia de la transfección mediada por p5RHH puede optimizarse aún más como lo sugiere la observación de un aumento de la eficacia de transfección cuando las partículas se incuban primero con albúmina sérica que se utiliza para probar la estabilidad sérica. Las mediciones del potencial zeta sugieren que la albúmina recubre las nanopartículas de p5RHH/ARNip, pero no está claro cómo esto mejora la transfección. Los estudios existentes han demostrado que la albúmina puede ayudar a la fusión de bicapas lipídicas a un pH bajo y esta actividad puede desempeñar un papel en el escape endosomal. La mejora observada en la eficacia de la transfección de ARNip debería establecer una vía interesante para mejorar los procedimientos de formulación para maximizar la eficacia de la transfección mediada por p5RHH.

La capacidad de p5RHH para transfectar ARNip en células cancerosas, células endoteliales e incluso macrófagos apunta a un amplio espectro de actividad de transfección mientras se mantienen las características de citotoxicidad favorables. Dado el tamaño de las nanopartículas (~ 190 nm), se abordaron los procesos de enfermedad que no requieren extravasación vascular a través de barreras endoteliales intactas. El cáncer, la angiogénesis y la aterosclerosis se caracterizan por una barrera endotelial discontinua con una pérdida de nanopartículas mejorada en los tejidos circundantes. En el cáncer, este efecto es ampliamente conocido como "permeabilidad y retención mejorada", y se han informado previamente de efectos similares para estados de aterosclerosis severa. Además, el tamaño de las nanopartículas en los ejemplos inmediatos debería proporcionar farmacocinéticas favorables y una semivida en suero al evitar tanto la filtración renal como la absorción por el sistema reticulendotelial. Las nanopartículas de p5RHH/ARNip también exhiben estabilidad de tamaño y retienen la capacidad de transfección del ARNip cuando se incuban en presencia de albúmina de suero humano durante 24 horas antes de la transfección, un problema que se ha reconocido que disminuye la actividad de algunos agentes de transfección de CPP. Aunque la protección detallada de ARNip y el análisis de estabilidad a largo plazo aún no se han realizado, estos datos sugieren que las nanopartículas de p5RHH/ARNip podrían proporcionar beneficios terapéuticos cuando se utilizan para la transfección en entornos *in vivo*.

Como tal, el nuevo derivado de melitina, p5RHH, muestra la capacidad de interactuar con el ARNip de forma electrostática y formar nanopartículas estables que muestran un suministro eficaz en el citoplasma con la posterior degradación específica de secuencia del ARNm y la disminución de la expresión de proteínas en una variedad de tipos de células. Los estudios no revelaron ningún signo de citotoxicidad, lo que sugiere la utilidad potencial de las nanopartículas de p5RHH/ARNip en entornos clínicos. La estabilidad de estas partículas en presencia de proteínas séricas sugiere que las nanopartículas de p5RHH/ARNip serían buenos candidatos de pruebas para suministrar ARNip *in vivo* en dianas intravasculares o en tejido enfermo caracterizado por disfunción de la barrera endotelial.

#### **Procedimientos para los ejemplos 1-4.**

##### *Preparación de nanoensamblajes de péptido/ARNip y análisis*

Se formularon los derivados de melitina por Genscript (Piscataway, NJ), se disolvieron a 10 mM en agua libre de RNasa/DNasa (Sigma, St. Louis, MO) y se almacenaron en alícuotas de 4  $\mu$ l a -80 °C antes de su uso. Se prepararon los complejos de transfección P5RHH/ARNip mediante la dilución de p5RHH 1:200 en solución salina tamponada con fosfato (PBS, Sigma), se agitaron en vortex durante 30 segundos, seguido de la adición de la cantidad apropiada de ARNip (concentración de reserva de 10  $\mu$ M en tampón ARNip 1x (Thermo) ) y se incubaron durante 40 minutos a 37 °C con agitación en un Eppendorf Thermomixer R. Se analizaron las nanopartículas resultantes para determinar la incorporación de ARNip por resolución en un gel de poliacrilamida al 12 % seguido de tinción con bromuro de etidio. Se realizaron la dispersión dinámica de la luz (DLS) y las mediciones del potencial zeta en un medidor de partículas Zeta Plus (Brookhaven Instruments, Newton, MA). Se realizó el análisis de la estabilidad del suero mediante la incubación de nanopartículas de péptido/ARNip recién formadas en albúmina de suero humano (HSA, Sigma) 10mg/ml durante la noche seguido de DLS y mediciones de potencial zeta.

##### *Cultivo celular*

Se mantuvieron las líneas celulares B16F10 y RAW264.7 (ATCC, Manassas, VA) en condiciones estándar de cultivo celular (37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % en una incubadora humidificada) en DMEM (Gibco, Carlsbad, CA) complementado con suero fetal bovino al 10 % (Gibco). Las células B16F10 que expresan establemente GFP se produjeron de la siguiente manera. Se transfectaron B16F10 (Lipofectamine 2000, Invitrogen) con una fusión de EGFP (pEGFP-N1, Clontech) y la secuencia PEST de la ornitina descarboxilasa de ratón (S421-V461) en pEF6V5HisTOPO (Invitrogen). Se seleccionaron células para cuatro rondas con clasificación de células por citometría de flujo sin selección de antibióticos. Una alícuota de células se mantuvo en cultivo continuo durante un mes sin un cambio notable en el nivel de expresión de EGFP. Se adquirieron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC, de sus siglas en inglés) de Lifeline Technologies (Frederick, MD) y se cultivaron en medio basal Vasculife (Lifeline Technologies) complementado con EGF 5 ng/ml, bFGF 5 ng/ml, IGF-1 15 ng/ml, ácido ascórbico 50 µg/ml, hidrocortisona hemisuccinato 1 µg/ml, sulfato de heparina 0,75 U/ml, L-glutamina 10 mM, suero bovino fetal al 2 % de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para todos los experimentos, se utilizaron HUVEC en el paso 3.

#### *Transfección de ARNip*

Las células se colocaron en placas de 6 pocillos 12 horas antes de la transfección y se cultivaron en condiciones estándar de cultivo celular. Se prepararon nanopartículas de p5RHH/ARNip y se incubaron con células durante 4 horas en un volumen final de 1 ml de Optimeml (Gibco) o medios apropiados complementados con FBS al 10 %. Las transfecciones se escalaron en consecuencia para las células colocadas en placas de 12 pocillos según el área de superficie del cultivo celular. Después de la transfección, se lavaron las células dos veces con PBS y se incubaron con medio de cultivo celular estándar durante otras 24-72 horas antes del análisis. Se utilizó Lipofectamine 2000 de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, se diluyó Lipofectamine 2000 en Optimeml hasta una concentración final de 8,4 µg/ml y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se añadió ARNip al lípido diluido y se incubó durante otros 40 minutos antes de la dilución hasta un volumen total de 1 ml con Optimeml para la transfección. El ARNip de eGFP (en sentido: 5'-GACGUAAACGGCCACAAGUUC-3'; SEQ ID NO: 56) se adquirió de Sigma. Se compraron ARNip específicos de los genes ARNip1 de MAPK9 de ratón de siGENOME, ARNip2 de STAT3 de ratón de siGENOME y ARNip2 de STAT3 humano de siGENOME en Dharmacon (Lafayette, CO). El ARNip aleatorio se compró a Qiagen (Valencia, CA).

#### *Transferencia de Western*

24 o 48 horas después de la transfección, se añadió 100-200 µl de tampón RIPA (Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, IgepalCA-630 al 1,0 %, desoxicolato de sodio al 0,5 %, dodecil sulfato de sodio al 0,1 %, EDTA 1 mM, glicerol al 5 %) con PMSF 1 mM y cóctel inhibidor de proteasa completa (Roche) a cada pocillo de una placa de 6 pocillos y se incubó en hielo durante 1 hora. Luego, se centrifugaron los lisados celulares a 4 °C durante 5 minutos y se almacenaron los sobrenadantes a -20 °C. Se resolvieron los lisados en geles Nupage Bis-Tris (Life Technologies) y se transfirieron a 0,22 µm de nitrocelulosa antes del bloqueo en albúmina de suero bovino al 5 % (Sigma) en TBS-T. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-GAPDH de conejo (1:1500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-β-actina de ratón (1:1000, Sigma), anti-STAT3 de ratón (1:1000, Cell Signaling, Danvers, MA), anti-JNK2 de conejo (1:1000, Cell Signaling). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-HRP de conejo (1:5000, Santa Cruz Biotechnology) and anti-HRP de ratón (1:5000, Santa Cruz Biotechnology). Las transferencias se desarrollaron utilizando el sustrato de transferencia Western ECL (Pierce, Rockford, IL). Se cuantificó la atenuación utilizando densitometría en ImageJ (NIH, Bethesda, MD) y se normalizó a un control no tratado. Todos los datos se presentan como promedio de 3 experimentos separados.

#### *PCR en tiempo real*

24 horas después de la transfección, se produjo ADNc utilizando el kit de ADNc FastLane Cell (Qiagen). Se almacenó el ADNc a -20 °C hasta su uso. Se cuantificaron los niveles de ARNm utilizando la detección de SYBR green en un sistema Applied Biosystems 7300 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) utilizando iTaq SYBR green con ROX (Bio-Rad, Hercules, CA). Quantitect Primer Assay (Qiagen) proporcionó cebadores específicos de genes para cada gen. Se normalizaron los genes de interés a la B-actina apropiada para la especie. Los resultados se informan como "factor de cambio" promedio en relación con los controles no tratados para 3 experimentos separados.

#### *Microscopía confocal*

Se cultivaron células B16F10 en cubreobjetos de vidrio y se transfectaron con ARNip anti-GFP marcado con Cy5.5 (Sigma) de acuerdo con el procedimiento de transfección estándar. 12 horas después de la transfección, se lavaron las células 3x en PBS y se fijaron en PFA al 4 % antes de montarlas en portaobjetos de vidrio (Vectashield Mounting Medium con DAPI, Vector Labs, Burlingame, CA). Se tomaron imágenes de las células mediante microscopía confocal en un Zeiss Meta 510 (Thornwood, NY).

#### *Citometría de flujo*

24 horas después de que se transfectaran las células B16-GFP con nanopartículas de p5RHH/ARNip que contenían ARNip específico de GFP o aleatorio, se tripsinizaron y se resuspendieron las células en tampón FACS (FBS al 0,2 % y EDTA 0,5 mM) para el análisis de fluorescencia de GFP.

*Ensayos de viabilidad celular*

Se determinó la viabilidad celular 72 horas después de la transfección utilizando Alamar Blue (Life technologies). En resumen, se diluyó Alamar Blue 1:10 en medio libre de rojo fenol y se incubó con células durante 2-4 horas. Se midió la fluorescencia en un lector de placas fluorescente con excitación a 570 nm y emisión a 585 nm (Varian Cary Eclipse, Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

*Ensayos de formación de tubos*

Se descongeló Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA) durante la noche a 4 °C en un baño de hielo y posteriormente se dejó gelificar en placas de 24 pocillos durante 1 hora a 37 °C. 24 horas después de la transfección con ARNip específico de STAT3 o de control, se tripsinizaron y se sembraron las HUVEC en matrigel a una densidad celular de 30.000 células/pocillo. La formación de tubos se dejó avanzar durante 24 horas antes de la visualización en un microscopio invertido. Se determinó una puntuación de formación de tubos en función de la longitud total de tubos por campo de visión normalizada a los controles no tratados según lo medido en ImageJ (NIH).

*Ensayos de migración de HUVEC*

Los fondos de las inserciones Transwell de 12 pocillos con un tamaño de poro de 1,0 µm (Corning, Tewksbury, MA) se recubrieron con gelatina porcina al 0,1 % (Sigma) a temperatura ambiente durante 1 hora. Las HUVEC transfectadas con ARNip específico de STAT3 o de control con 24 horas de anticipación fueron luego tripsinizadas y resuspendidas en medios libres de factor de crecimiento y se agregaron a la cámara transwell apical a una densidad de 30.000-50.000 células/pocillo. La cámara inferior contenía factor de crecimiento libre de medio basal VasculLife ± bFGF 5 ng/ml. Se dejaron migrar las células a través del inserto de polímero durante 12 horas. Se retiraron las células no migradas de la cámara apical con un hisopo de algodón estéril y se determinaron los números de células migradas a través de Alamar Blue. Los datos se presentan como la migración normalizada promedio de 3 experimentos separados. Para la visualización, se cortaron los insertos y se montaron en portaobjetos de vidrio. Se visualizaron los núcleos celulares con tinción DAPI en una Olympus BX610 (Tokio, Japón) y se informaron como el número promedio de células por campo de visión.

*Ensayo de formación de células espumosas/tinción con Oil Red O*

48 horas después de la transfección con ARNip específico de JNK2 o de control, se incubaron células RAW264.7 ± Ac-LDL 50 µg/ml (Intracel, Frederick, MD) durante 24 horas adicionales. Luego se tiñeron las células con Oil-Red O para visualizar la formación de células espumosas. En resumen, se disolvió Oil-Red O en metanol puro a (0,5 g/100 ml) durante la noche antes de la filtración a través de un filtro de 0,22 µm. Luego se diluyó la reserva de Oil-Red O 3:5 en agua destilada para preparar la solución de trabajo Oil-Red O y se filtró por segunda vez a través de un filtro de 0,22 µm. Se fijaron las células en PFA al 4 % durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con metanol al 60 % antes de teñir en la solución de trabajo Oil-Red O durante 15 minutos. Después de la tinción, se lavaron las células una vez con metanol al 60 % y una vez con agua destilada antes de montar en portaobjetos de vidrio.

**Introducción para los ejemplos 9-14.**

La degradación post-transcripcional del ARNm a través de ARN de interferencia (ARNi) proporciona un enfoque dirigido para silenciar la expresión génica que puede resultar beneficioso en el tratamiento de muchas enfermedades clínicamente relevantes. El ARNi se puede inducir mediante el suministro de ARN de interferencia pequeño (ARNip) en el citoplasma de una célula de mamífero, después de lo cual la incorporación del ARNip en los complejos de silenciamiento inducidos por ARN (RISC, de sus siglas en inglés) conduce a una escisión específica de la secuencia del ARNm complementario. Dada la actividad del ARNip en el citoplasma, el ARNip debe pasar por alto las membranas celulares impermeables para alcanzar el compartimento citoplasmático. Desafortunadamente, debido al gran peso molecular del ARNip (~ 21 kDa) y la carga negativa, el ARNip desnudo no puede difundirse libremente a través de las membranas celulares, lo que requiere un sistema de suministro eficaz para ayudar a la absorción celular y el posterior escape endosomal.

Los sistemas de suministro de ARNip comunes incluyen lípidos y polímeros catiónicos, que son eficaces, pero están obstaculizados por una posible toxicidad. Trabajos recientes se han centrado en péptidos poli-básicos o dominios de transducción de péptidos (PTD, de sus siglas en inglés) para la transfección de ARNip debido a su falta de efectos secundarios tóxicos. Desafortunadamente, muchos estudios han informado de solo un éxito modesto en el logro de un suministro de ARNip altamente eficaz cuando se forman complejos con péptidos como consecuencia de un atrapamiento endosomal excesivo. Reconocer el atrapamiento endosomal como la barrera primaria que obstaculiza el progreso de los vectores de ARNip basados en péptidos hace hincapié en que deben desarrollarse nuevas estrategias para mejorar la transfección mediada por péptidos. Por consiguiente, los inventores proponen que los péptidos que alteran la membrana que llevan una carga neta positiva pueden proporcionar una alternativa inexplorada para la transfección eficaz de ARNip debido a su doble funcionalidad tanto para el ARNip complejo como para alterar los compartimentos endosómicos.

Desafortunadamente, es difícil predecir la utilidad de derivados de melitina en la transfección de ARNip debido a que

los mecanismos que permiten el éxito de la transfección mediada por péptido aún no han sido completamente aclarados. Por ejemplo, el trabajo reciente de van Asbeck y col. (2013; ACS Nano 7: 3797-3807) concluye que la sensibilidad a la descomplejación mediante macromoléculas polianiónicas contribuye a mejorar la transfección, pero no se estableció el papel que desempeña la descomplejación en el suministro de ARNip al citoplasma. Además, los péptidos fusogénicos del virus de la gripe sensibles al pH se han aprovechado previamente para aumentar la transfección mediada por péptidos, pero su capacidad para mejorar la transfección de ARNip puede atribuirse al aumento del empaquetamiento o la absorción de ARNip, y no al escape endosomal. Si bien las nanopartículas de CPP/ARNip se han caracterizado bien desde una perspectiva físico-química, los mecanismos implicados en la transfección de nanocomplejos de péptido/ARNip que contribuyen a una derivación exitosa del atrapamiento endosomal y la posterior inducción de ARNi aún no se han dilucidado. Se requieren estudios adicionales con respecto al procesamiento intracelular de nanocomplejos de péptido/ARNip y el mecanismo de liberación del ARNip en el citoplasma para desarrollar más los péptidos para la transfección de ARNip.

Los inventores han informado previamente que el derivado de melitina, p5RHH, es capaz de la transfección de ARNip con una  $CI_{50}$  tan baja como 25 nM sin citotoxicidad significativa en todas las dosis probadas (Hou y col., 2013; 34:3110-3119). En los ejemplos en el presente documento, este péptido se emplea para el suministro de ARNip de p65 y p100/52 para la atenuación simultánea de rutas de señalización de NF $\kappa$ B tanto canónicas como no canónicas en un modelo murino de Virus-1 T-Linfotrópico humano (HTLV-1) inducido por leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos (ATLL). Para mejorar la estabilidad, se muestra en el presente documento que una formulación de p5RHH recubierta de albúmina exhibe una notable eficacia de transfección atribuible al desensamblaje de nanopartículas desencadenado por pH. Estudios detallados sobre el mecanismo de acción revelan que la exposición al pH endosomal desencadena tanto el desensamblaje de nanopartículas como el escape endosomal. Además, se desprende de las comparaciones con los derivados de melitina que no funcionan que la alteración endosomal sola no da como resultado una inducción exitosa de ARNi, pero requiere la liberación simultánea de ARNip del vector.

Los resultados presentados en el presente documento ofrecen parámetros generales que producen un suministro eficaz de ARNip en el citoplasma mediante vectores peptídicos, que pueden ayudar en el desarrollo de nanocomplejos de péptido/ARNip no covalentes para las terapias de ARNip.

#### **Ejemplo 9: Formulación de nanopartículas de p5RHH/ARNip estabilizadas con albúmina.**

Para formular las nanopartículas de p5RHH/ARNip, se disuelve p5RHH (reserva 10 mM en DI H<sub>2</sub>O) 1:200 en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, se agita en vortex durante 30 segundos, seguido de la adición de la cantidad apropiada de ARNip (reserva 100  $\mu$ M en 1x ARNip) y se incuban a 37 °C durante 40 minutos (**FIG. 14A**). Se eligieron incubaciones de 40 minutos en función del tamaño de partícula según se rastrearon mediante microscopía electrónica Deep-Etch. Las micrografías electrónicas (**FIG. 15A**) indican que las partículas formadas en este punto de tiempo no han comenzado a mostrar una agregación adicional, lo que permite una plataforma para la estabilización cinética a través del recubrimiento de superficie con albúmina. Notablemente, las incubaciones de 40 minutos también muestran una eficacia de transfección máxima basada en la atenuación de la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) en células de melanoma B16-F10 (ATCC, Manassas, VA) (**FIG. 15B**).

Se sabe que la albúmina proporciona una estabilidad mejorada de las nanopartículas mediante el recubrimiento de las nanopartículas para prevenir la floculación. Las formulaciones estabilizadas con albúmina incluyen una incubación posterior de 30 minutos en presencia de albúmina de suero humano 0,5 mg/ml (reserva 50 mg/ml en DI H<sub>2</sub>O) antes de su uso. Se midió el tamaño de las nanopartículas de p5RHH/ARNip estabilizadas con albúmina 72 horas después de la formulación en ~ 55 nm  $\pm$  18 mediante microscopía de fuerza atómica en modo húmedo (**FIG. 14B**), lo que indica que la albúmina evita la floculación de las nanopartículas de p5RHH/ARNip.

#### **Ejemplo 10. Mecanismo de entrada celular de nanopartículas de péptido/ARNip.**

Teniendo en cuenta la incertidumbre que rodea la entrada celular de las nanopartículas de péptido/ARNip, se realizaron ensayos de absorción para proporcionar información sobre el mecanismo mediante el cual p5RHH logra el suministro citoplásmico de ARNip. Los ensayos de citometría de flujo que representan la absorción de ARNip aleatorio marcado con Alexa488 empaquetado con p5RHH proporcionan una herramienta experimental conveniente para determinar el papel de rutas endocíticas selectas en la absorción de nanopartículas de p5RHH/ARNip. La incubación de células a 4 °C provoca una inhibición casi completa de la absorción de p5RHH/ARNip, que rechaza así la hipótesis de que p5RHH media la translocación directa de la membrana para la liberación citoplásmica de ARNip (**FIG. 16**). En cambio, los estudios sobre la absorción de p5RHH/ARNip en presencia de inhibidores de la endocitosis indican que la macropinocitosis es la ruta principal responsable de la absorción de p5RHH/ARNip (**FIG. 17A-D**). El inhibidor de la macropinocitosis EIPA reduce drásticamente la absorción de p5RHH/ARNip, mientras que el inhibidor de las caveolas, la filipina y el inhibidor de la endocitosis mediada por clatrina (CME, de sus siglas en inglés), PAO, no tienen efecto sobre la absorción de p5RHH/ARNip.

Se ha demostrado que la utilización de inhibidores endosómicos para evaluar los mecanismos de absorción no es específico y también es dependiente del tipo celular. En consecuencia, los ensayos de inhibición de la absorción se realizaron durante solo 40 minutos a concentraciones de inhibidor que se determinaron que eran específicas de la

ruta esperada (**FIG. 18**), como se demostró mediante la inhibición de marcadores de transferrina endosomal estándar (CME) y dextrano de 70 kDa (macropinocitosis). Se sabe que las células B16 no expresan caveolina-1 y, como es lógico, la absorción del marcador de caveolas Toxina B del cólera no se puede medir en este tipo de células (observación no publicada).

5 La microscopia confocal confirma los datos de la citometría de flujo, que ilustran la colocalización fuerte de p5RHH/Cy3-ARNip con FITC-dextrano de 70 kDa (**FIG. 17J**), pero no con FITC-Transferrina (**FIG. 17I**). Se incubaron las células con marcadores de absorción durante solo 40 minutos para minimizar la liberación de ARNip marcado con Cy-3 en el citoplasma, lo que podría producir una fluorescencia citoplásmica o nuclear que, de lo contrario, podría confundir el análisis y, por lo tanto, no se tomaron imágenes de las células que exhiben liberación  
10 citoplásmica para evitar estos problemas. De forma interesante, el ARNip rápido (< 1 hora de absorción y liberación) marcado con Cy-3 confirma el rápido escape endosomal inducido por las nanopartículas de p5RHH/ARNip (**FIG. 19**).

Estos resultados están de acuerdo con las reglas generales que regulan la absorción celular de muchos péptidos cargados positivamente que contienen restos básicos. Específicamente, los restos de arginina pueden formar interacciones iónicas bidentadas con los proteoglicanos de la superficie celular, lo que da como resultado una  
15 asociación cercana con la membrana plasmática. Además, estas interacciones de unión no específica pueden estimular los reordenamientos de actina que se requieren para la absorción de la fase fluida por la macropinocitosis. La fuerte absorción de péptidos cargados positivamente indica que la asociación electrostática con la membrana plasmática y la posterior absorción en fase líquida es suficiente para lograr una absorción sustancial de péptido/ARNip.

#### 20 **Ejemplo 11. Tráfico de ARNip posterior a la endocitosis.**

El tráfico adecuado de ARNip posterior al evento endocítico inicial también es de vital importancia para una transfección exitosa del ARNip. En particular, el pH de los endosomas y los lisosomas se controla estrictamente mediante la acidificación a través de ATPasas vacuolares unidas a la membrana y puede proporcionar un desencadenante para la liberación de ARNip ambientalmente sensible de las nanopartículas de p5RHH/ARNip. Para  
25 determinar si el bajo pH generado por estas ATPasas vacuolares está involucrado en la liberación de ARNip de los endosomas, se incubaron las células en presencia de bafilomicina A1 durante la transfección. En comparación con las células de control transfectadas sin bafilomicina A1 (**FIG. 20E**), las células tratadas con bafilomicina A1 (**FIG. 20F**) condujeron a una pérdida casi completa de la atenuación de GFP según se determinó mediante citometría de flujo. Debido a que la bafilomicina A1 podría estar disminuyendo la absorción de p5RHH/ARNip, se utilizó la  
30 evaluación por citometría de flujo de la absorción de ARNip marcado con fluorescencia en células B16 para asegurar que la concentración de bafilomicina A1 utilizada en estos ensayos no afectara la absorción de p5RHH/ARNip (**FIG. 20A-C**). Estos datos confirman la importancia de la acidificación endosomal en la liberación citoplásmica de ARNip cuando se suministra a las células a través de p5RHH.

#### **Ejemplo 12: Integridad de las nanopartículas a pH ácido.**

35 Debido a que la acidificación endosomal es crucial para la capacidad de p5RHH para suministrar ARNip al citoplasma, se incubaron nanopartículas de p5RHH/ARNip a pH bajo para determinar cómo un ambiente cada vez más ácido afecta la integridad de las nanopartículas. Los ensayos de unión al colorante que utilizan la tinción de ácido nucleico TOPRO3 revelan que el ARNip se hace cada vez más accesible a un pH  $\leq 5,5$ , como se manifiesta por el aumento de la intensidad de la fluorescencia de TOPRO3 (**FIG. 21A**). Para determinar si el aumento de la  
40 accesibilidad del tinte se correlacionaba con una mayor liberación de ARNip, se analizaron muestras adicionales en un gel de poliacrilamida al 20 % para resolver el ARNip libre (**FIG. 21B**). Según estos datos, es evidente que el ARNip no se vuelve libre para migrar al gel hasta que se alcanza un pH de 4,5. En conjunto, estos ensayos implican un mecanismo dependiente del pH para el desensamblaje de partículas y la liberación de ARNip, con un pH más bajo (4,5) requerido para que el ARNip se libere completamente que el requerido para iniciar el desensamblaje de  
45 partículas (pH 5,5). En contraste con p5RHH, p5RWR no puede responder al pH como se demuestra por una falta de fluorescencia de TOPRO3 a pH  $\leq 5,5$  (**FIG. 21A**), y una falta de liberación de ARNip medida por la movilidad del gel (**FIG. 21B**).

Para corroborar el desensamblaje de partículas, se cuantificó la liberación de p5RHH dependiente del pH de las nanopartículas de p5RHH/ARNip después de la diálisis a través de una membrana de diálisis 10 K. Estos ensayos  
50 revelan que aproximadamente el 40 % de p5RHH permaneció libre después del ensamblaje de la partícula, y se produjo una fuerte liberación de p5RHH a pH  $\leq 5,5$  (**FIG. 21C**). Esta dependencia del pH coincide con la dependencia del pH observada para la unión del tinte de ARNip, lo que confirma que el pH, de hecho, desencadena el desensamblaje de las nanopartículas y la posterior liberación de p5RHH y de ARNip.

La capacidad lítica de p5RHH liberada se puede cuantificar *in vitro* con ensayos de hemólisis de glóbulos rojos (RBC, de sus siglas en inglés). Cuando se incubaba a un pH decreciente, la capacidad de las nanopartículas de p5RHH/ARNip para lisar RBC aumenta, debido a la liberación de p5RHH libre a pH  $\leq 5,5$  (**FIG. 21D**). Estos ensayos se realizaron a 4 °C para disminuir la tasa de autohemólisis observada a temperaturas más altas. La hemólisis de los RBC indica que p5RHH libre es capaz de lisar estructuras unidas a la membrana y podría, posiblemente, alterar las  
55 membranas endosómicas en células intactas (**FIG. 22**).

Se observó alteración endosomal en células vivas mediante tinción con naranja de acridina. Las células se cargaron primero con naranja de acridina (10  $\mu\text{M}$ , 15 minutos), que emiten fluorescencia roja a pH bajo en el endosoma pero verde a pH citoplásmico. La alteración endosómica se puede visualizar mediante un aumento de la fluorescencia verde citoplásmica en presencia de cloroquina 100  $\mu\text{M}$  (**FIG. 21F**). De forma similar, las células transfectadas con p5RHH/ARNip también liberaron naranja de acridina de las vesículas endosómicas citoplásmicas, lo que confirma la eficaz alteración del endosoma, mientras que las células transfectadas con nanopartículas del p5RWR/ARNip no mostraron alteración endosomal (**FIG. 21H, G**). Estos resultados resaltan la importancia del desensamblaje de nanopartículas y la liberación de péptidos activos en la membrana medidos *in vitro* para la alteración del endosoma en un contexto celular (**FIG. 21I-K**). Mientras las nanopartículas de p5RHH/ARNip son sensibles al pH y liberan p5RHH para la alteración endosómica, las nanopartículas de p5RWR/ARNip no se desensamblan y no alteran la integridad endosomal.

Un mecanismo potencial para las propiedades sensibles al pH de las nanopartículas de p5RHH/ARNip parece ser la protonación de restos de histidina. Con un pKa de 6, la histidina probablemente proporciona el desencadenante crítico para el desensamblaje de partículas debido a que el aumento de la unión del tinte al ARNip y la liberación de p5RHH se registran a pH < pKa de la histidina. Tradicionalmente, la protonación de histidina a menudo se ha utilizado como un desencadenante para el suministro de ARNip en el contexto del efecto de esponja de protones, en el que la capacidad tamponante de los polímeros que contienen histidina conduce a la acumulación de contraiones de Cl<sup>-</sup> y, en última instancia, a la ruptura osmótica del endosoma. En comparación con los procedimientos que dependen del tamponamiento endosomal para la ruptura osmótica, la presencia de solo dos restos de histidina en el presente péptido sugiere que estas modificaciones propuestas a la melitina probablemente no produzcan una capacidad de tamponamiento adecuada para lograr el efecto de esponja de protones para el escape endosomal. Como ejemplo, se ha demostrado que el TAT debe aumentarse con al menos diez restos de histidina para la liberación exitosa de ácido nucleico en el citoplasma. Si bien no se puede descartar por completo que exista alguna contribución del efecto de esponja de protones a la endosomolisis mediante p5RHH observada para la liberación de naranja de acridina, la necesidad de solo dos restos de histidina es una indicación de que el pH desencadena el desensamblaje de partículas y la posterior liberación del péptido lítico de membrana. Es probable que la ruptura osmótica juegue solo un papel menor, si lo hay.

#### **Ejemplo 13. Atenuación exitosa de GFP en células B16 GFP mediante nanopartículas de ARNip.**

Cuando se examina la capacidad de p5RHH para suministrar ARNip de GFP a células B16-GFP, se observa una fuerte disminución en la expresión de GFP a ARNip 50 nM mediante transferencia de Western 24 horas después de la transfección (**FIG. 23A**). Además, la transfección de células en presencia de cloroquina 50  $\mu\text{M}$ , un conocido agente endosomolítico, no mejora la atenuación. La falta de atenuación adicional por la cloroquina verifica que la propia p5RHH sea capaz de liberar completa y eficazmente el ARNip del compartimento endosómico, un hallazgo que se visualiza mediante microscopía confocal (**FIG. 23D, F**).

A pesar de la absorción casi igual de las nanopartículas de p5RWR/ARNip (**FIG. 23B**), p5RWR es incapaz de inducir la atenuación de GFP incluso en presencia de cloroquina (**FIG. 23A**). La microscopía confocal revela un alto grado de atrapamiento endosomal, lo que sugiere que las nanopartículas de p5RWR/ARNip no alcanzan el citoplasma (**FIG. 23C**), a menos que se traten con cloroquina (**FIG. 23E**). El hecho de que la atenuación de GFP permanezca dañada a pesar de la liberación endosomal por la cloroquina (**FIG. 23A**) indica que la accesibilidad del ARNip al complejo silenciador inducido por el ARN está deteriorada, lo que refleja la escasa liberación de ARNip de las nanopartículas basadas en p5RWR observada por la unión de TOPRO3 y los ensayos de cambio de movilidad de gel *in vitro* (**FIG. 21A, B**).

Estos datos resaltan que la capacidad de las nanopartículas de p5RHH/ARNip para desensamblarse en respuesta a un pH bajo es crucial para el suministro de ARNip al citoplasma. Específicamente, el desensamblaje de nanopartículas con la liberación de ARNip del vector y la endosomolisis concurrente por p5RHH es un evento coordinado que produce el acceso del ARNip libre al compartimento citoplásmico. El papel esencial de la liberación coordinada de ARNip y el escape endosomal en la transfección exitosa de ARNip es bien conocido. Por ejemplo, la liberación prematura de ARNip en el endosoma permite la degradación del ARNip por hidrolasas endosómicas. Por otra parte, los péptidos que se unen demasiado fuerte al ARNip también tienen la hipótesis de prevenir el éxito del ARNi. En consecuencia, la liberación de ARNip de las nanopartículas de p5RHH/ARNip debe ser concurrente con el escape endosomal para la degradación máxima del ARNm.

#### **Ejemplo 14. Transfección *in vivo* altamente eficaz de ARNip dirigidos a las rutas de NFkB en el modelo de leucemia/linfoma de linfocitos T adultos (ATLL).**

El potencial terapéutico de las nanopartículas de p5RHH/ARNip recubiertas con albúmina se demostró mediante la transfección altamente eficaz de los ARNip que se dirigen a las rutas de NFkB canónicas y no canónicas en las células F8, un modelo murino de ATLL inducido por HTLV-1. El factor de transcripción NFkB fue elegido como una diana terapéutica debido a su papel central en la ATLL, donde promueve la resistencia a la quimioterapia mediante el impulso de la expresión de proteínas antiapoptóticas. Mientras que los inhibidores del proteasoma de molécula pequeña y los inhibidores del complejo IKK pueden disminuir la activación de NFkB en algunos modelos de enfermedad ATLL, las preguntas sobre su especificidad y capacidad para inactivar NFkB *in vivo* resaltan la

necesidad de terapias más específicas. La sinergia potencial proporcionada por la inhibición directa de las rutas de NFκB tanto canónicas como no canónicas a través de ARNip puede ser la clave para el bloqueo exitoso de la señalización de NFκB requerida para el éxito terapéutico.

5 Se eligieron ARNip para dirigirse a la subunidad p65 de la ruta canónica y a la subunidad p100/p52 de la ruta no canónica. La transferencia de Western realizada 24 horas después de la transfección reveló una disminución dependiente de la dosis en la expresión de ambas proteínas que no se observó cuando se transfectaron las células con un control de ARNip aleatorio (**FIG. 24A, B**). Los ensayos con Alamar blue (**FIG. 24C**) 48 horas después de la transfección demuestran que la atenuación de estas rutas *in vitro* es terapéuticamente relevante, ya que se registra una fuerte disminución de la viabilidad celular con los ARNip de p65 y p100/p52. Además, está claro que el bloqueo de la ruta de NFκB no canónica con el ARNip de p100/p52 (CI<sub>50</sub> ~ 100 nM) es superior al bloqueo de la ruta canónica (CI<sub>50</sub> ~ 200 nM) en esta línea celular. Se supone que la ruta no canónica desempeña un papel más importante en la promoción de la expresión de proteínas antiapoptóticas que la ruta canónica, al marcarla como la diana más deseable para modular la proliferación de células ATLL. Los datos presentados en el presente documento, que utilizan el suministro de ARNip mediado por p5RHH, no solo confirman esta hipótesis, sino que también revelan una respuesta sinérgica cuando se dirigen a las rutas de NFκB canónicas y no canónicas con una única formulación p5RHH/ARNip que empaqueta simultáneamente ambos ARNip de p65 y p100/p52. La utilización de esta formulación de p5RHH/ARNip de doble diana mejora la muerte celular mediada por el bloqueo de NFκB, con una CI<sub>50</sub> ~ 50 nM. Es importante tener en cuenta que a pesar de la capacidad de lisar RBC *in vitro* y las membranas endosómicas *in vivo*, la transfección con ARNip aleatorio no produce ninguna toxicidad de las células F8. El trabajo realizado por los inventores ha demostrado que el truncamiento N-terminal de la melitina disminuye su capacidad lítica en 2 órdenes de magnitud (observación no publicada), y aunque parece que p5RHH es capaz de lisar endosomas a alta concentración, p5RHH es seguro después de la liberación y dilución endosomal en el citoplasma. Dada la seguridad de p5RHH en el cultivo de tejidos, se realizaron experimentos piloto para examinar la localización tumoral de las nanopartículas de p5RHH/ARNip cuando se suministraron *in vivo*. Las imágenes de IVIS y la microscopía confocal revelan el suministro de tumores de ARNip aleatorios marcados con Cy5.5 (**FIG. 24D-G** y **FIG. 27**) cuando se introducen por inyección en la vena de la cola en ratones portadores de tumores de ATLL espontáneos en una dosis de 1 mg/kg. Los tumores de ratones inyectados con nanopartículas de p5RHH/Cy5.5-ARNip exhiben acumulación de ARNip de Cy5.5 en la periferia, mientras que el ARNip de Cy5.5 limitado se encuentra en el centro del tumor (**FIG. 25**).

30 Los intentos anteriores de dirigirse a la expresión de NFκB en sí se han centrado en la utilización de oligonucleótidos de ADN antisentido desnudos o la expresión de ARNhc lentiviral, que tienen un potencial terapéutico limitado. La utilización de oligonucleótidos antisentido es ineficiente, ya que requiere un orden de magnitud más de oligonucleótidos *in vitro* que la formulación de ARNip presentada en el presente documento. Por otra parte, los vectores virales para la expresión de ARNhc presentan innumerables desafíos para los ensayos en humanos que van desde la inducción de cáncer hasta la toxicidad asociada con los efectos de saturación. Debido a la capacidad de dirigir simultáneamente ambas rutas de NFκB, se cree que el enfoque actual de ARNip muestra que la utilización de p5RHH para la transfección altamente eficaz y de baja toxicidad de ARNip dirigido a NFκB refleja una estrategia sinérgica para el tratamiento de ATLL u otros procesos de enfermedad que son conducidos por la inducción de NFκB.

#### 40 **Conclusión para los ejemplos 1-14.**

En resumen, los péptidos líticos de membrana pueden reclutarse como agentes de escape endosómicos para promover el suministro citoplásmico de ARNip evitando el atrapamiento de ARNip asociado con la transfección mediada por PTD alternativa. Se presenta una formulación de p5RHH/ARNip estabilizado con albúmina con un tamaño final de ~ 55 nm. Estas nanopartículas son endocitadas por la absorción de la fase fluida mediante macropinocitosis. La posterior acidificación endosomal proporciona un desencadenante para el desensamblaje de partículas mediadas por pH con liberación simultánea de ARNip y escape endosomal provocado por la liberación de p5RHH libre (**FIG. 26**). Cuando se utiliza para la transfección simultánea de los ARNip de p65 y p100/p52 en un modelo de ATLL, p5RHH media una disminución sinérgica en la viabilidad celular, lo que sugiere el potencial de más estudios *in vivo*. La capacidad única de las nanopartículas de p5RHH/ARNip para coordinar eficazmente la liberación de péptidos y ARNip con endosomal augura un potencial para la utilización de la transfección mediada por p5RHH en una variedad de sustratos de enfermedades. Además, el análisis del mecanismo de acción de p5RHH proporciona una perspectiva que puede guiar el desarrollo adicional de futuros vectores peptídicos para la transfección de ARNip.

#### **Materiales y procedimientos para los ejemplos 9-14.**

##### 55 *Preparación de nanopartículas de péptido/ARNip y análisis*

Los derivados de melitina p5RHH (VLTTGLPALISWIRRRHRRHC; SEQ ID NO: 1) y p5RWR (VLTTGLPALISWIKRKRQQRWRRR; SEQ ID NO: 55) se sintetizaron por Genscript (Piscataway, NJ), se disolvieron a 10 mM en agua libre de RNAsa/DNAsa (Sigma, St. Louis, MO) y se almacenaron en alícuotas de 4 µl a -80 °C antes de su uso. Se prepararon los complejos de transfección p5RHH/ARNip mediante la dilución de p5RHH 1:200 en solución salina tamponada con fosfato (PBS, Gibco), se agitaron en vortex durante 30 segundos, seguido

de la adición de ARNip (concentración de reserva de 10  $\mu$ M en tampón ARNip 1x (Thermo Scientific, Waltham, MA)) para lograr una relación péptido a ARNip de 100 a 1, y se incubaron durante 40 minutos a 37 °C con agitación en un Eppendorf Thermomixer R. Para experimentos con animales, se incubaron el péptido y el ARNip a una concentración 10 veces mayor durante 10 minutos en hielo. Se realizó microscopía de fuerza atómica en modo húmedo por ARC Technologies (White Bear Lake, MN).

#### *Cultivo celular*

Las líneas celulares B16-F10 (ATCC, Manassas, VA) se mantuvieron en condiciones de cultivo celular estándar (37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % en una incubadora humidificada) en DMEM (Gibco, Carlsbad, CA) complementado con suero fetal bovino al 10 % (Gibco). Las células F8 se cultivaron en RPMI (Gibco) complementado con suero fetal bovino al 10% de acuerdo con publicaciones anteriores.

#### *Inhibición de la absorción por citometría de flujo*

Se incubaron las células B16-F10 con ARNip marcado con alexa 488 envasado con p5RHH (25 nM), FITC-Transferrina (5  $\mu$ g/ml, Life Technologies) o FITC-Dextran de 70 kDa (100  $\mu$ g/ml, Sigma) en presencia o ausencia de inhibidores de la endocitosis durante 40 minutos. Después de la incubación, se lavaron las células 3x en PBS, se tripsinizaron y se resuspendieron en tampón FACS (HBSS con FBS al 0,2 % y EDTA 0,5 mM) para el análisis de citometría de flujo. Los inhibidores se utilizaron de la siguiente manera: EIPA (80  $\mu$ M, Sigma), filipina (100  $\mu$ g/ml, Sigma), y PAO (10  $\mu$ M Sigma).

#### *Microscopía confocal*

Se cultivaron las células B16-F10 en cubreobjetos de vidrio durante la noche antes de la incubación con nanopartículas p5RHH y marcadores de absorción apropiados durante 40 minutos o 24 horas. Se agregaron nanopartículas de ARNip p5RHH/Cy-3 a una concentración final de ARNip de 200 nM en presencia de FITC-Dextrano de 70 kDa (10 mg/ml) o FITC-Transferrina (25  $\mu$ g/ml). Después de la incubación, se lavaron las células en hielo 3x en PBS durante 10 minutos y se fijaron en paraformaldehído al 4 % antes de montarlas en portaobjetos de vidrio (medio de montaje Vectashield con DAPI, Vector Labs, Burlingame, CA). Se tomaron imágenes de las células en un Zeiss Meta 510 (Thornwood, NY).

#### *Análisis de la atenuación de GFP*

Las células B16 GFP se colocaron en placas a 150.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos y se transfectaron 12 horas más tarde a una concentración final de ARNip 50 nM en 1 ml de DMEM al 10% en presencia o ausencia de bafilomicina A1 1  $\mu$ M (reserva 1 mM en DMSO, Sigma). 24 horas después de que se transfectaron las células B16-GFP con nanopartículas de p5RHH/ARNip que contenían ARNip específico de GFP o aleatorio, se tripsinizaron y se resuspendieron las células en tampón FACS (FBS al 0,2 % y EDTA 0,5 mM) para el análisis de fluorescencia de GFP. El ARNip de eGFP (en sentido: 5'-GACGUAAACGGCCACAAGUUC-3; SEQ ID NO: 84 ') se compró a Sigma. El ARNip aleatorio se compró a Qiagen (Valencia, CA).

#### *Accesibilidad del tinte de ARNip a pH bajo*

Las nanopartículas de p5RHH/ARNip preformadas se incubaron en solución salina equilibrada de Hank (HBSS, Gibco) al pH indicado durante 30 minutos en presencia de TOPRO3 (Life Technologies) diluida de 1 a 1000. La fluorescencia de TOPRO3 se mide en una placa de 96 pocillos con excitación a 642 nm y emisión a 661 nm. Los valores de fluorescencia se normalizan luego a los controles de ARNip solo y se presentan como el promedio de 3 experimentos separados.

#### *Ensayos de movilidad en gel dependientes de pH*

Las nanopartículas de p5RHH/ARNip se incuban en HBSS al pH indicado durante 30 minutos antes de la resolución en un gel de TBE-PAGE al 20 %. El ARNip se visualiza mediante tinción con SYBR GOLD en 1x TBE (IBIScientific) diluido de 1 a 10000 durante 15 minutos.

#### *Tinción de naranja de acridina para la alteración lisosomal*

Las células B16F10 colocadas en cubreobjetos se cargan con naranja de acridina a 10  $\mu$ M durante 15 minutos y se lavan 3x en PBS antes de la incubación en presencia de nanopartículas de p5RHH/ARNip en DMEM al 10 % a una concentración final de ARNip de 100 nM durante 12 horas. Como alternativa, se expusieron las células a cloroquina (Sigma) a 100  $\mu$ M durante 15 minutos antes de la obtención de imágenes. Se visualizaron las células vivas mediante microscopía de fluorescencia en una Olympus BX610 (Tokio, Japón).

#### *Hemólisis de RBC*

Se aislaron glóbulos rojos de conejo (RBC) de la sangre completa mediante centrifugación y se lavaron en PBS 3x antes de su almacenamiento a 4 °C. Antes de los estudios de hemólisis, se lavaron los RBC 3x en HBSS con pH apropiado y se diluyeron de 1 a 5000. Luego se incubaron los RBC en el tampón específico de pH con

nanopartículas de p5RHH/ARNip durante 12 horas. Los restos de RBC se sedimentaron mediante centrifugación y el contenido de hemoglobina del sobrenadante se midió por absorbancia UV a 550 nm. Los valores de absorbancia se normalizaron luego contra la lisis máxima con los controles de p5RHH solo y se presentaron como el promedio de 3 experimentos separados.

#### 5 *Análisis de la atenuación de NFκB en células F8*

Las células F8 se colocaron en placas de 6 pocillos a 200.000 células/pocillo y se transfectaron a concentraciones variables de ARNip en un volumen final de 1 ml con el ARNip designado. El ARNip 5 (p65) de NFκB de ratón siGENOME y el ARNip 1 (p100/p50) de NFκB 2 de ratón siGENOME se compraron a Dharmacon (Lafayette, CO). El ARNip aleatorio se compró a Qiagen (Valencia, CA). 24 horas después de la transfección, se sedimentaron las células F8 a 1000 rpm en un Precision AKR-1000. Se resuspendieron luego los sedimentos celulares en 100 µl de tampón RIPA (Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, IgepalCA-630 al 1,0 %, desoxicolato de sodio al 0,5 %, dodecilsulfato de sodio al 0,1 %, EDTA 1 mM, glicerol al 5 %) con PMSF 1 mM y cóctel inhibidor de proteasa completo (Roche) e incubados en hielo durante 1 hora. Luego, se centrifugaron los lisados celulares a 4 °C durante 5 minutos y se almacenaron los sobrenadantes a -20 °C. Se resolvieron los lisados en geles NupageBis-Tris (Life Technologies) y se transfirieron a 0,22 µm de nitrocelulosa antes del bloqueo en albúmina de suero bovino al 5 % (Sigma) en TBS-T. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-p65 de conejo (1:1000, Cell Signaling, Danvers, MA), anti-p100/p50 de conejo (1:1000, Cell Signaling). Los anticuerpos secundarios: anti-HRP de conejo (1:5000, Santa Cruz Biotechnology). Las transferencias se desarrollaron utilizando el sustrato de transferencia Western ECL (Pierce, Rockford, IL).

#### 20 *Mediciones de viabilidad de células F8*

Las células F8 se colocaron en placas de 24 pocillos 12 horas antes de la transfección a 20.000 células/pocillo en 400 µl y se cultivaron en condiciones estándar de cultivo celular. Las nanopartículas de p5RHH/ARNip se prepararon e incubaron con células durante 48 horas en un volumen final de 600 µl antes de las mediciones de viabilidad utilizando Alamar Blue (Life Technologies). En resumen, se diluyó Alamar Blue de 1 a 10 en medio de cultivo celular y se incubó con células durante 2-4 horas. Se midió la fluorescencia en un lector de placas fluorescente con excitación a 570 nm y emisión a 585 nm (Varian Cary Eclipse, Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

#### *Experimentos con animales*

Los protocolos de animales experimentales fueron aprobados por el Comité de Cuidado de Animales de la Escuela de Medicina de la Universidad de Washington. Los ratones transgénicos con tumores espontáneos fueron un regalo del laboratorio de Ratner. Los ratones con tumores avanzados se seleccionaron para experimentos piloto y se inyectaron con una dosis única a 1 mg/kg 24 horas antes del sacrificio. Se perfundieron los animales con solución salina y se extirparon los tumores para obtener imágenes de IVIS y seccionamiento congelado.

#### **Ejemplo 15. Citotoxicidad de p5RHH.**

Se transfectaron las células B16 GFP con concentraciones crecientes de nanopartículas de p5RHH/ARNip que contenían ARNip específico de GFP o aleatorio. Para comparación, las células B16 GFP también se transfectaron con concentraciones crecientes de ARNip específico de GFP o aleatorio utilizando lipofectamine 2000. El ARN extraído de las células transfectadas se analizó mediante análisis de transferencia de Northern y se determinó la viabilidad normalizada de las células B16 transfectadas (**FIG. 28**). A diferencia de las transfecciones que utilizan Lipofectamine 2000 (**FIG. 28B, D**), se determinó que p5RHH/ARNip es seguro en todas las dosis analizadas (**FIG. 28A, C**).

#### **Ejemplo 16. El bloqueo de NFκB alivia los síntomas artríticos en la artritis inducida por anticuerpos de colágeno.**

El potencial terapéutico de las nanopartículas de p5RHH/ARNip recubiertas con albúmina se demostró en un modelo murino de artritis inducida por anticuerpos de colágeno. En resumen, el modelo comprende la inyección de un anticuerpo monoclonal contra el colágeno II, seguido unos días más tarde por la inyección de lipopolisacárido para mejorar los síntomas artríticos. El modelo murino inducido por anticuerpos de colágeno y la administración de ARNip es como se describe en la **FIG. 29**.

Se utilizó ARNip dirigido a la subunidad p65 de la ruta canónica. Se utilizó ARNip aleatorio como control. El ARNip se marcó con Cy5.5. La concentración de ARNip en cada administración fue de 1 mg/kg de ARNip. A tres ratones se les administró solución salina, a tres ratones se les administró ARNip aleatorio, y a 4 ratones se les administró ARNip de p65. La gravedad de la artritis se determinó mediante la evaluación del grosor del tobillo, la puntuación artrítica y el peso corporal en los días 0, 3, 4, 6, 8 y 10.

Como se muestra en la **FIG. 30**, el bloqueo de NFκB que utiliza partículas de p5RHH/ARNip con ARNip dirigidas a la subunidad p65 de la ruta canónica disminuye la artritis inducida por anticuerpos de colágeno medida por el grosor del tobillo (**FIG. 30A**), y la puntuación artrítica (**FIG. 30B**). Las imágenes de IVIS muestran que el ARNip se acumula en las patas artríticas de los animales (**FIG. 30C**).

Además, se utilizaron imágenes moleculares por ultrasonidos para visualizar la eficacia del tratamiento de la artritis utilizando p5RHH/ARNip con ARNip dirigido a la subunidad p65. La imagen ultrasónica mide los cambios en la composición física (fibrosis, edema, células inflamatorias, etc.) y la organización de los tejidos a una resolución de subvoxel para tejidos similares que se someten a tratamiento (Hughes y col., 2011 J Acoust Soc Am. 129: 3756; Hughes 2011 IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control. 58:2361-2369; Hughes y col., 2007 Ultrasound Med Biol. 33:1236-1243; Hughes y col., 2007 Journal of the Acoustical Society of America. 121:3542-3557; Hughes y col., 2013 J Acoust Soc Am. 133:283-300; Hughes y col., 2009 Journal of the Acoustical Society of America. 126:2350-2358)

Las imágenes de la entropía muestran que tres huesos de la pata son visibles (azul a rojo) 4 días después del tratamiento con solución salina (placebo). Mientras que tres de los huesos de la pata son visibles en animales 4 días después del tratamiento con p5RHH/ARNip con ARNip dirigido a la subunidad p65, sus valores de píxeles están mucho más cerca del fondo normal (FIG. 31).

### **Ejemplo 17. Nanopartículas de ARNip para suprimir la respuesta inflamatoria en artritis inducida por anticuerpos de colágeno.**

El objetivo de este estudio es demostrar la capacidad de las nanopartículas de ARNip para suprimir la respuesta inflamatoria en la artritis inducida por anticuerpos de colágeno en ratones. La ruta NFκB se seleccionó como un punto de control central en la inflamación mediante la incorporación de ARNip contra las subunidades p65, que son los principales reguladores transcripcionales de la ruta de NFκB canónica. Las nanopartículas se prepararon de la forma habitual y se inyectaron por vía intravenosa en tres dosis diarias consecutivas después del establecimiento de la inflamación articular. Las respuestas conjuntas se midieron a lo largo del tiempo y se realizaron un número de otras pruebas para definir la seguridad del material.

Inducción y tratamiento de la artritis: La artritis se indujo utilizando el modelo de artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) con el cóctel de 5 clones del anticuerpo monoclonal artrogénico Artrógeno-CIA (Chondrex, Inc.). Se inyectaron i.p. ratones DBA/1J macho de seis a ocho semanas de edad (Taconic) con 1,5 mg del cóctel de anticuerpos de 5 clones en el día 0 y 50 ug de LPS en el día 3. A partir del día 4, cuando se estableció la artritis temprana en todos los ratones, los animales recibieron diariamente una serie de inyecciones i.v. de solución salina, nanopartículas con secuencia de ARN aleatorio o ARNip de p-65 (i.v. 1mg/kg por la vena de la cola). La manifestación clínica de la artritis se evaluó diariamente en una escala de 0-3 (0 = sin hinchazón o eritema, 1 = leve hinchazón o eritema, 2 = eritema moderado e hinchazón en múltiples dedos o pata completa, 3 = eritema pronunciado e hinchazón de la totalidad pata, puntuación máxima de 3 x 4 patas = 12 por ratón). El cambio de la línea base en el grosor de la pata se determinó diariamente mediante calibradores de cuadrante y se determinó un cambio promedio en el grosor del tobillo para cada ratón a partir de las dos mediciones de la pata trasera. Los ratones también se pesaron cada dos días y se calculó el porcentaje de pérdida de peso desde el inicio. El día 9, se sacrificaron los ratones y su sangre, patas y órganos se recogieron para su análisis.

Análisis de citoquinas: Se homogeneizaron las patas en 1 ml de PBS y se eliminaron los lisados mediante centrifugación. Las concentraciones de TNF-α, IL-6 y MCP-1 en los lisados de las patas se midieron mediante una matriz de perlas citométricas utilizando el kit inflamatorio de ratón (BD Bioscience) de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes. Se midió la IL-1β mediante ELISA (R&D Systems) de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes.

Parámetros hematológicos y químicos del suero: El día 10 se extrajo sangre de la vena cava inferior y se envió para WBC/diferenciales y químicos del suero (funciones hepáticas y renales). El análisis se realizó por el Departamento de Medicina Comparada de la Universidad de Washington.

Respuestas inmunes a las nanopartículas: Se midieron la IgG y la IgM total utilizando un ensayo ELISA estándar. En resumen, la placa de 96 pocillos se recubrió con anticuerpo de captura de cabra anti-IgG de ratón (Southern Biotechnology Associates, Inc.) o anti-IgM de ratón (Southern Biotechnology Associates, Inc.) (1 ug/ml en PBS) y se incubó a 4 °C durante la noche. Después de lavar y bloquear con BSA al 1 % en PBS, se añadieron a pocillos sueros de ratón diluidos (diluciones 1:40,00-1:400,00) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Después del lavado, se agregaron a la placa 100 ul de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (Southern Biotechnology Associates, Inc.) o anti-IgM de ratón (Southern Biotechnology Associates, Inc.) conjugado con HRP (dilución 1:3.000 en BSA al 1 % en PBS) y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Después de lavar, se agregaron a cada pocillo 100 μl de solución de peróxido-cromógeno (R&D Systems) y se leyó el desarrollo del color a 450 nm con un lector SpectraMax Plus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, Estados Unidos). Se utilizaron IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) e IgM (Rockland Immunochemicals) de ratón purificadas para establecer las curvas estándar.

Para medir la respuesta específica de IgM o IgG al péptido p5RHH o a las nanopartículas de péptido:ARNip, las placas Immunlon 4 HBX (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) se incubaron con 100 μl/pocillo de péptido P5RHH o nanopartículas de ARNip-P5PHR en concentración de péptidos P5RHH de 2 μM a 4 °C durante la noche. Para determinar la cantidad de materiales recubiertos en la superficie de los pocillos de la placa, se midieron el péptido P5RHH no unido o las nanopartículas de ARNip-P5RHH utilizando un espectrofluorómetro fluorescente

(Varian Inc, Palo Alto, CA), ya que P5RHH tiene un resto de triptófano. Los espectros de emisión de fluorescencia de triptófano (300 nm a 500 nm) se midieron después de la excitación a 280 nm. Se han generado curvas estándar y las cantidades de materiales no unidos se calcularon frente a curvas estándar. Para la placa recubierta con péptido, el péptido recubierto tiene una concentración de 2,21 µg/ml; Para la placa recubierta de nanopartículas (NP) de ARNip-P5RHH, la concentración de péptido fue de 3,58 µg/ml. Después de lavar y bloquear con BSA al 1 % en PBS, se añadieron sueros de ratón diluidos (dilución 1:10-1:100) a los pocillos y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (Southern Biotechnology Associates, Inc.) o anti-IgM de ratón (Southern Biotechnology Associates, Inc.) conjugado con HRP como anteriormente. El desarrollo del color se realizó utilizando una solución de peróxido-cromógeno (R&D Systems) como anteriormente. Los datos se presentan como absorbancia directa (DO a 450 nm).

Absorción de nanopartículas fuera del objetivo: Se inyectaron los ratones i.v. con 200 µl de HBSS o nanopartículas de péptido:ARN aleatorio marcadas con Cy3. Después se sacrificaron 30 ratones y se obtuvieron glóbulos blancos y esplenocitos de sangre periférica para el análisis de partículas marcadas con Cy3 asociadas a células mediante citometría de flujo. Las células también se tiñeron con Ly6G (neutrófilos) y Ly6C (monocitos) para buscar la colocalización específica.

Activación del complemento: Se inyectaron los ratones i.v. con 200 µl de nanopartículas de péptido:ARNip. La sangre se extrajo de la vena cava inferior a los 30 minutos después de la inyección de NP directamente en tubos de EDTA 10 mM para evitar una activación adicional del complemento ex vivo. Se preparó plasma fresco a partir de sangre recogida para ELISA C3a. En resumen, se recubrieron las placas durante la noche a 4 °C con anticuerpo monoclonal de rata anti-C3a de ratón (4 µg/ml) (BD Pharmingen). Después de bloquearse con diluyente reactivo (BSA al 1 % en PBS) durante 1 hora a TA, se lavaron las placas 3X con tampón de lavado ELISA (Tween 20 al 0,05 % (v/v) en PBS) y se incubaron con muestras (100 µl de plasma recién obtenido del mismo día diluido 1:100 en diluyente reactivo) durante 1 hora a TA. Se lavaron las placas (3X), seguido de incubación con anti-C3a de ratón biotinilado (250 ng/ml) durante 1 hora a TA. Después del lavado, se incubaron las placas con estreptavidina-peroxidasa (400 ng/ml; Sigma) durante 30 minutos, se lavaron y se agregaron 100 µl de solución de peróxido-cromógeno (R&D Systems) a cada pocillo y se leyó el desarrollo de color a 450 nm con un lector SpectraMax Plus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, Estados Unidos). Se utilizó un ratón recombinante C3a (BD Pharmingen) para establecer la curva estándar.

Resultados: Tanto el grosor del tobillo como la puntuación de la artritis se reducen al principio del procedimiento de la enfermedad por el ARNip activo pero no el aleatorio (**FIG. 32**). El peso corporal no difirió entre los grupos. p65, la diana molecular obtenida a partir de lisados de pata, se redujo mediante el ARNip activo (**FIG. 33**). Se observó una amplia supresión de citoquinas en las patas, lo que concuerda con la inhibición del punto de control de NFκB corriente arriba.

Los análisis de sangre realizados en el último día del experimento no revelaron cambios en los RBC, WBC (incluido el diferencial) o plaquetas (**FIG. 34**). Las pruebas de función renal no revelaron cambios en las químicas séricas relevantes ni en las medidas de la función renal (**FIG. 35**) y las pruebas de función hepática tampoco cambiaron (**FIG. 36**). Los estudios de activación del complemento no revelaron aumentos significativos asociados con la terapia con nanopartículas, lo que indica la evitación de la activación inmune innata (**FIG. 37**). Se observó muy ligera elevación en el recuento de esplenocitos con ninguna alteración en los tipos de células que estaban presentes, lo que indica efectos mínimos sobre la capacidad de respuesta inmune a las nanopartículas (**FIG. 38**).

La capacidad de respuesta inmune nativa al desafío con el anticuerpo anti-CD3 en los linfocitos T CD4+ de los bazo se conservó bien para los efectores inmunes importantes, lo que indica que la capacidad de respuesta inmune sistémica se mantendría, a pesar de la inhibición local amplia de la inflamación en las articulaciones afectadas (**FIG. 39**). No se observó una inducción a corto plazo de anticuerpos contra las nanopartículas de ARNip, lo que indica una falta de estimulación de la inmunidad adaptativa y un potencial para evitar la resistencia al agente después de las inyecciones en serie (**FIG. 40**). No se observaron respuestas inmunitarias para el ARNip desnudo o las partículas de ARNip completamente formadas, lo que confirma la falta de estimulación de la inmunidad adaptativa (**FIG. 41**).

Para descartar el suministro de complejos de nanopartículas a las articulaciones por parte de los glóbulos blancos, la citometría de flujo confirmó la falta de absorción de partículas en la circulación periférica por los neutrófilos y los monocitos, que muestran solo señales mínimas de las nanopartículas asociadas con estos tipos de células, que de otro modo son componentes prominentes del proceso inflamatorio. Esto sugiere que el tipo probable de célula diana ya reside en las articulaciones y no se inhibe en la circulación periférica antes de llegar a las articulaciones (**FIG. 42**). En el bazo, también es evidente que los neutrófilos y los monocitos no absorben las partículas de manera significativa, lo que confirma que las nanopartículas evitan el bazo y no estimularán una respuesta inmune, ni serán transportados a los tejidos inflamados por los esplenocitos activados (**FIG. 43**).

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> WASHINGTON UNIVERSITY  
WICKLINE, Samuel A.  
HOU, Kirk

ES 2 693 518 T3

<120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA LA TRANSFECCIÓN DE POLINUCLEÓTIDOS

<130> 047563-466806

<150> US 61/748.615

<151> 03/01/2013

5 <150> US 61/869.634  
<151> 23/08/2013

<150> US 61/873.187  
<151> 03/09/2013

<160> 56

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> SINTETIZADO

<400> 1

Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg  
1 5 10 15

His Arg Arg His Cys  
20

20 <210> 2  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> SINTETIZADO

25 <400> 2

Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg  
1 5 10 15

His

30 <210> 3  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> SINTETIZADO

<400> 3

Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg  
1 5 10 15

His Arg

35 <210> 4  
<211> 19

ES 2 693 518 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> SINTETIZADO

5 <400> 4

Val	Leu	Thr	Thr	Gly	Leu	Pro	Ala	Leu	Ile	Ser	Trp	Ile	Arg	Arg	Arg
1				5					10					15	

His Arg Arg

<210> 5  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> SINTETIZADO

<400> 5

Val	Leu	Thr	Thr	Gly	Leu	Pro	Ala	Leu	Ile	Ser	Trp	Ile	Arg	Arg	Arg
1				5					10					15	

His Arg Arg His  
 20

15 <210> 6  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> SINTETIZADO

<400> 6

Leu	Thr	Thr	Gly	Leu	Pro	Ala	Leu	Ile	Ser	Trp	Ile	Arg	Arg	Arg	His
1				5					10					15	

<210> 7  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> SINTETIZADO

<400> 7

Leu	Thr	Thr	Gly	Leu	Pro	Ala	Leu	Ile	Ser	Trp	Ile	Arg	Arg	Arg	His
1				5					10					15	

30 Arg

<210> 8  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> SINTETIZADO

ES 2 693 518 T3

<400> 8

Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His  
1 5 10 15

Arg Arg

<210> 9

<211> 19

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SINTETIZADO

<400> 9

Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His  
1 5 10 15

Arg Arg His

10

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> SINTETIZADO

<400> 10

Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His  
1 5 10 15

Arg Arg His Cys  
20

20

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SINTETIZADO

25

<400> 11

Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His  
1 5 10 15

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> SINTETIZADO

<400> 12

Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg  
1 5 10 15

ES 2 693 518 T3

<210> 13  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> SINTETIZADO

<400> 13

Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg  
1 5 10 15

Arg

10 <210> 14  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> SINTETIZADO

15 <400> 14

Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg  
1 5 10 15

Arg His

20 <210> 15  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> SINTETIZADO

<400> 15

Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg  
1 5 10 15

Arg His Cys

25 <210> 16  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> SINTETIZADO

30 <400> 16

Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His  
1 5 10

35 <210> 17  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 693 518 T3

<223> SINTETIZADO

<400> 17

Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg  
 1 5 10 15

5 <210> 18  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> SINTETIZADO

10 <400> 18

Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg Arg  
 1 5 10 15

15 <210> 19  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> SINTETIZADO

<400> 19

Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg Arg  
 1 5 10 15

His

20 <210> 20  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> SINTETIZADO

<400> 20

Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg Arg  
 1 5 10 15

His Cys

30 <210> 21  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> SINTETIZADO

<400> 21

35 Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His  
 1 5 10

<210> 22  
 <211> 14

ES 2 693 518 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> SINTETIZADO

5 <400> 22

Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg  
 1 5 10

<210> 23  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> SINTETIZADO

<400> 23

Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg Arg  
 1 5 10 15

<210> 24  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> SINTETIZADO

<400> 24

Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg Arg His  
 1 5 10 15

<210> 25  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> SINTETIZADO

<400> 25

Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg Arg His  
 1 5 10 15

<210> 26  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> SINTETIZADO

<400> 26

Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His  
 1 5 10

<210> 27  
 <211> 13

30 Cys

35 <220>  
 <223> SINTETIZADO

<400> 26

40 <210> 27  
 <211> 13

ES 2 693 518 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> SINTETIZADO  
 5 <400> 27  
  
           Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg  
           1                          5                                  10  
  
 <210> 28  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> SINTETIZADO  
  
 <400> 28  
  
           Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg Arg  
           1                          5                                  10  
  
 15 <210> 29  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <223> SINTETIZADO  
  
 <400> 29  
  
           Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg Arg His  
           1                          5                                  10                                  15  
  
 <210> 30  
 <211> 16  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> SINTETIZADO  
  
 <400> 30  
  
           Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg Arg His Cys  
           1                          5                                  10                                  15  
 30  
  
 <210> 31  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 35 <220>  
 <223> SINTETIZADO  
  
 <400> 31  
  
           Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His  
           1                          5                                  10  
  
 <210> 32  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia artificial

ES 2 693 518 T3

<220>  
<223> SINTETIZADO

<400> 32

Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg  
1 5 10

5 <210> 33  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> SINTETIZADO

<400> 33

Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg Arg  
1 5 10

15 <210> 34  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> SINTETIZADO

<400> 34

20 Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg Arg His  
1 5 10

<210> 35  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> SINTETIZADO

<400> 35

Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg Arg His Cys  
1 5 10 15

30 <210> 36  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> SINTETIZADO

35 <400> 36

Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His  
1 5 10

40 <210> 37  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> SINTETIZADO

ES 2 693 518 T3

<400> 37

Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg  
1 5 10

<210> 38

<211> 12

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SINTETIZADO

<400> 38

Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg Arg  
1 5 10

10

<210> 39

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> SINTETIZADO

<400> 39

Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg Arg His  
1 5 10

20

<210> 40

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SINTETIZADO

25

<400> 40

Ala Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg Arg His Cys  
1 5 10

30

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SINTETIZADO

<400> 41

Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg  
1 5 10

35

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> SINTETIZADO

<400> 42

ES 2 693 518 T3

Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg Arg  
1 5 10

5 <210> 43  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> SINTETIZADO  
  
<400> 43

Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg Arg His  
1 5 10

10 <210> 44  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
15 <223> SINTETIZADO  
  
<400> 44

Leu Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg Arg His Cys  
1 5 10

20 <210> 45  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> SINTETIZADO  
  
<400> 45

Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg Arg  
1 5 10

25 <210> 46  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
30 <220>  
<223> SINTETIZADO  
  
<400> 46

Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg Arg His  
1 5 10

35 <210> 47  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> SINTETIZADO  
  
40 <400> 47

Ile Ser Trp Ile Arg Arg Arg His Arg Arg His Cys  
1 5 10

ES 2 693 518 T3

<210> 48  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> SINTETIZADO  
 <400> 48  
  

	Ser	Trp	Ile	Arg	Arg	Arg	His	Arg	Arg	His
	1			5						10

  
 10 <210> 49  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> SINTETIZADO  
 15 <400> 49  
  

	Ser	Trp	Ile	Arg	Arg	Arg	His	Arg	Arg	His	Cys
	1			5						10	

  
 20 <210> 50  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> SINTETIZADO  
 <400> 50  
  

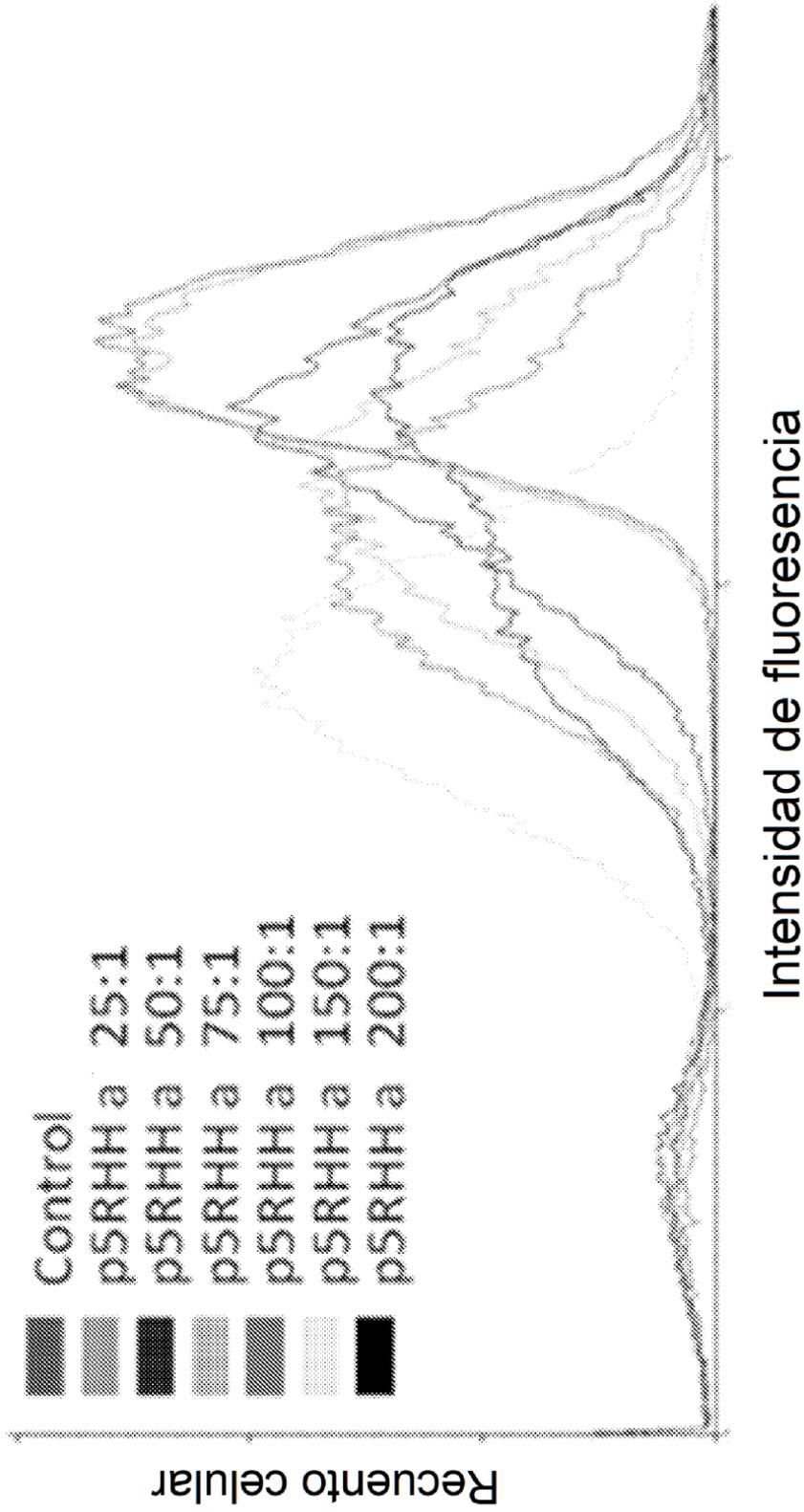
	Trp	Ile	Arg	Arg	Arg	His	Arg	Arg	His	Cys
	1			5						10

  
 25 <210> 51  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 30 <220>  
 <223> SINTETIZADO  
  
 <400> 51  
 ggaguaccugaagcuau                      19  
  
 35 <210> 52  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> SINTETIZADO  
  
 40 <400> 52  
 gaaagaagac agagccuau                      19  
  
 <210> 53  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Apis cerana  
 45 <400> 53

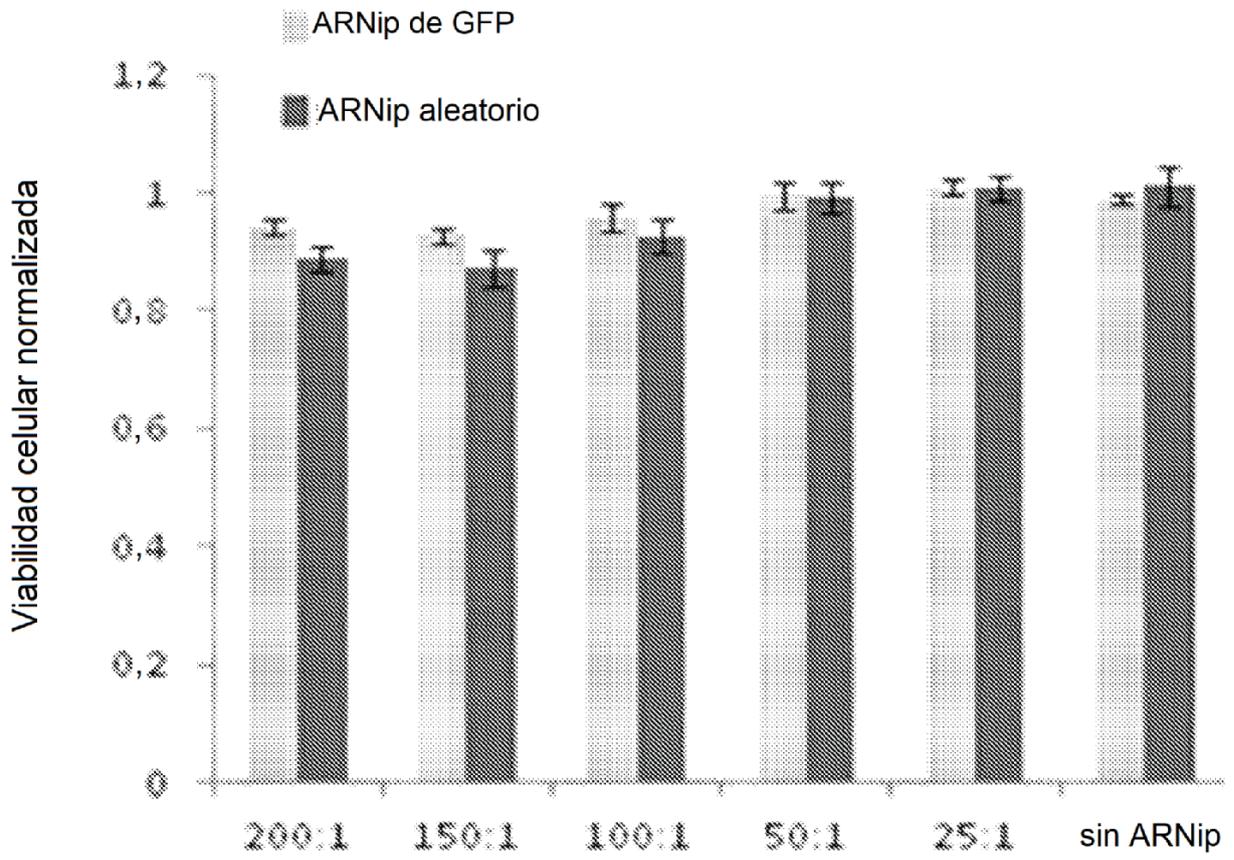


## REIVINDICACIONES

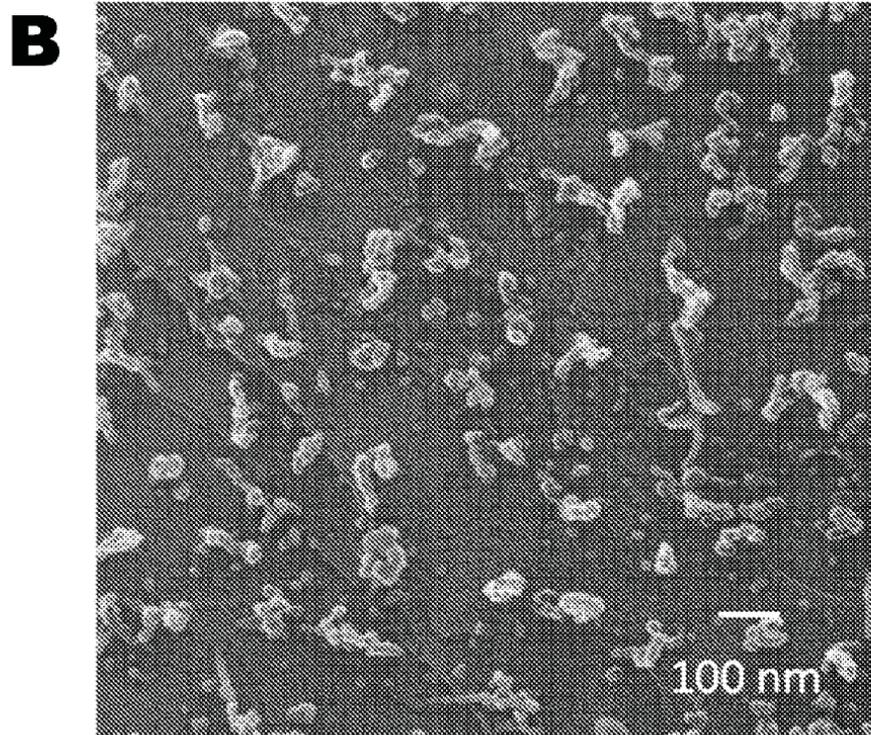
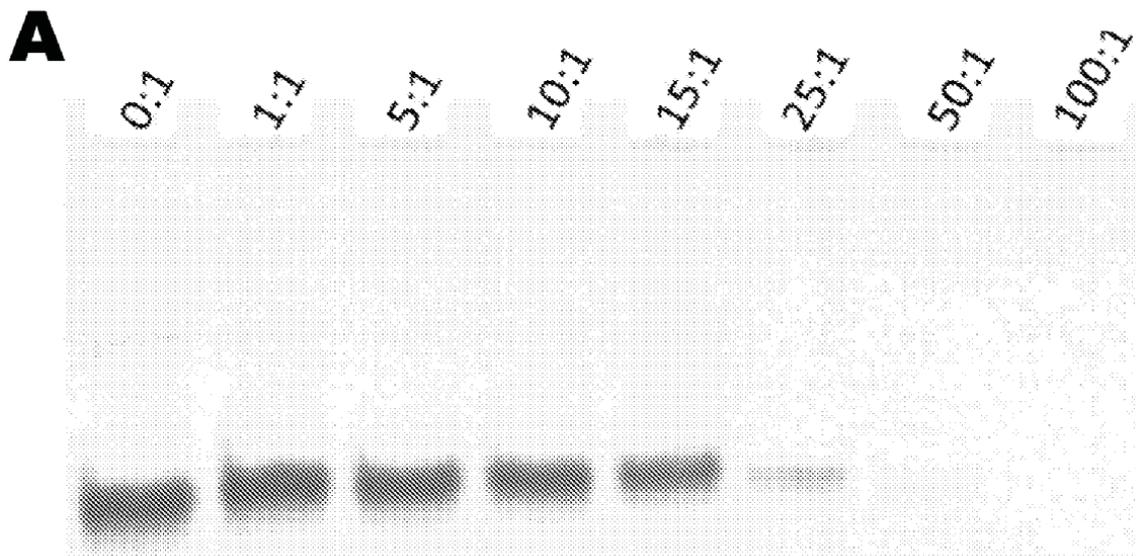
1. Una composición farmacéutica que comprende un complejo péptido-polinucleótido, comprendiendo el complejo péptido-polinucleótido una relación molar de péptido:polinucleótido que es más de aproximadamente 50:1 y menos de aproximadamente 200:1, en el que el péptido es (a) no citotóxico y capaz de afectar a la liberación de un polinucleótido desde un endosoma de una célula, y (b) comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que la relación molar de péptido a oligonucleótido es de aproximadamente 50:1 a aproximadamente 100:1.
3. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el complejo es una nanopartícula con un diámetro de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 200 nm.
4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el péptido comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el péptido comprende al menos una región catiónica y al menos un resto de histidina localizado adyacente a o dentro de al menos una región catiónica del péptido.
6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el polinucleótido es un ARN no codificante capaz de regular o inhibir la expresión de una secuencia de ácido nucleico.
7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el polinucleótido es un ARN de interferencia pequeño (ARNip) o un microARN (miARN).
8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el complejo está recubierto con albúmina.
9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el polinucleótido del complejo altera al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en STAT3, JNK2, p65 y p100/52.
10. Un procedimiento *in vitro* de suministro de un polinucleótido al citoplasma de una célula, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una célula con un complejo péptido-polinucleótido, comprendiendo el complejo péptido-polinucleótido una relación molar de péptido:polinucleótido que es más de aproximadamente 50:1 y menos de aproximadamente 200:1, en el que el péptido es (a) no citotóxico y capaz de afectar a la liberación de un polinucleótido desde un endosoma de una célula, y (b) comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
11. Un complejo péptido-polinucleótido, comprendiendo el complejo péptido-polinucleótido una relación molar de péptido:polinucleótido que es más de aproximadamente 50:1 y menos de aproximadamente 200:1, en el que el péptido es (a) no citotóxico y capaz de afectar a la liberación de un polinucleótido desde un endosoma de una célula, y (b) comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, para su uso en
- (i) la alteración de un nucleótido normalmente asociado con la ruta de señalización de NFκB, por lo tanto, tratar un tumor;
  - (ii) la alteración de un nucleótido normalmente asociado con la ruta de señalización de NFκB y, por lo tanto, tratar la artritis;
  - (iii) la alteración de la expresión de STAT3 en una célula y, por lo tanto, inhibir la angiogénesis;
  - (iv) la alteración de la expresión de JNK2 en una célula y, por lo tanto, inhibir la formación de células espumosas;
  - o
  - (v) la alteración de la expresión de p65 en una célula y, por lo tanto, tratar la artritis,
- en el que el polinucleótido se suministra al citoplasma de una célula en un sujeto que lo necesite.
12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que:
- (a) el polinucleótido altera un nucleótido normalmente asociado con la ruta de señalización de NFκB;
  - (b) el polinucleótido altera un nucleótido normalmente asociado con la ruta de señalización de NFκB;
  - (c) el polinucleótido altera la expresión de STAT3 en una célula;
  - (d) el polinucleótido altera la expresión de JNK2 en una célula; o
  - (e) el polinucleótido altera la expresión de p65 en una célula.



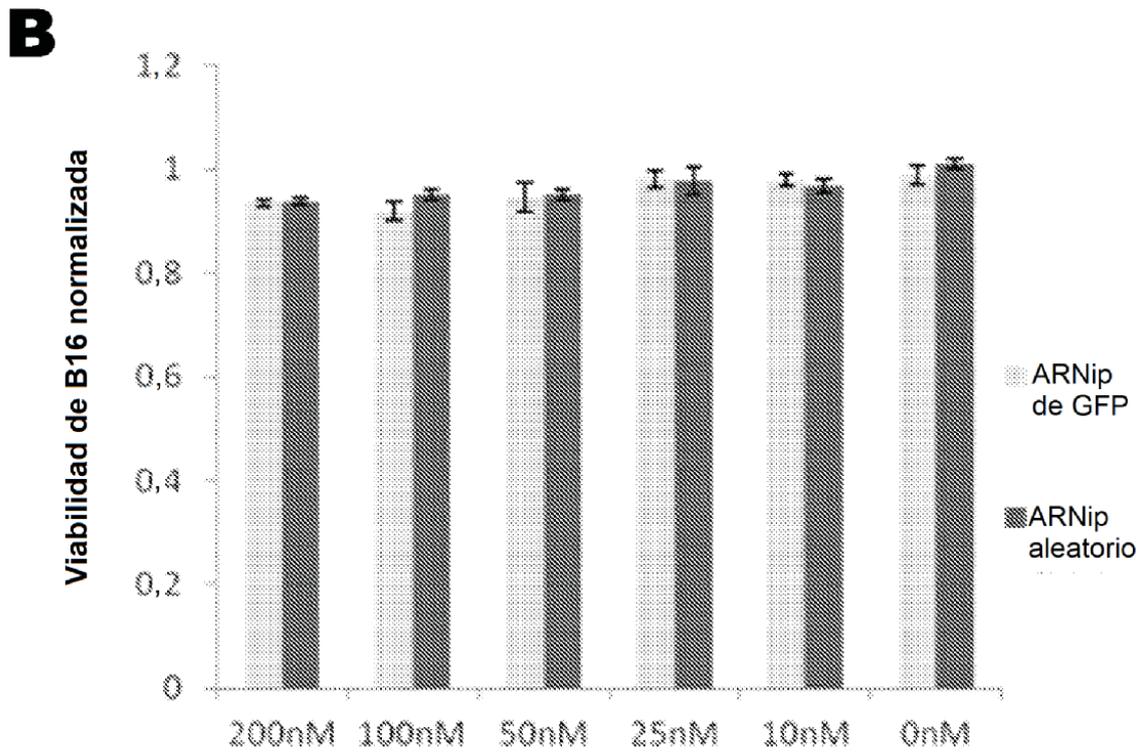
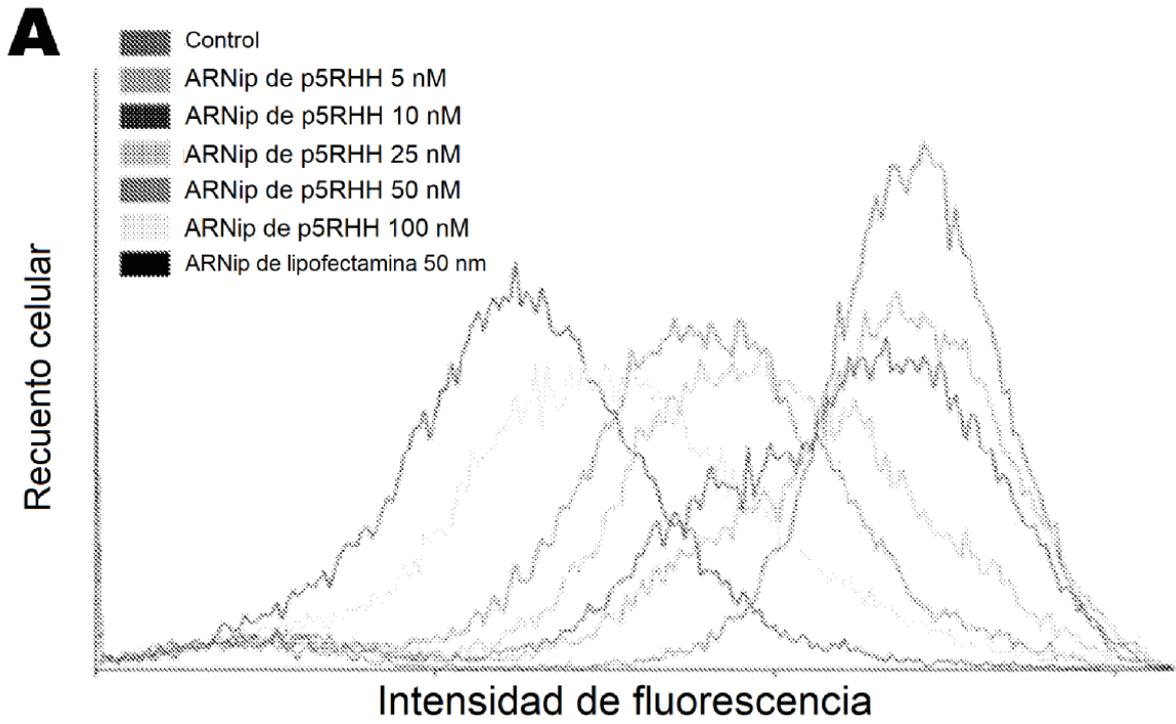
**FIG. 1A**



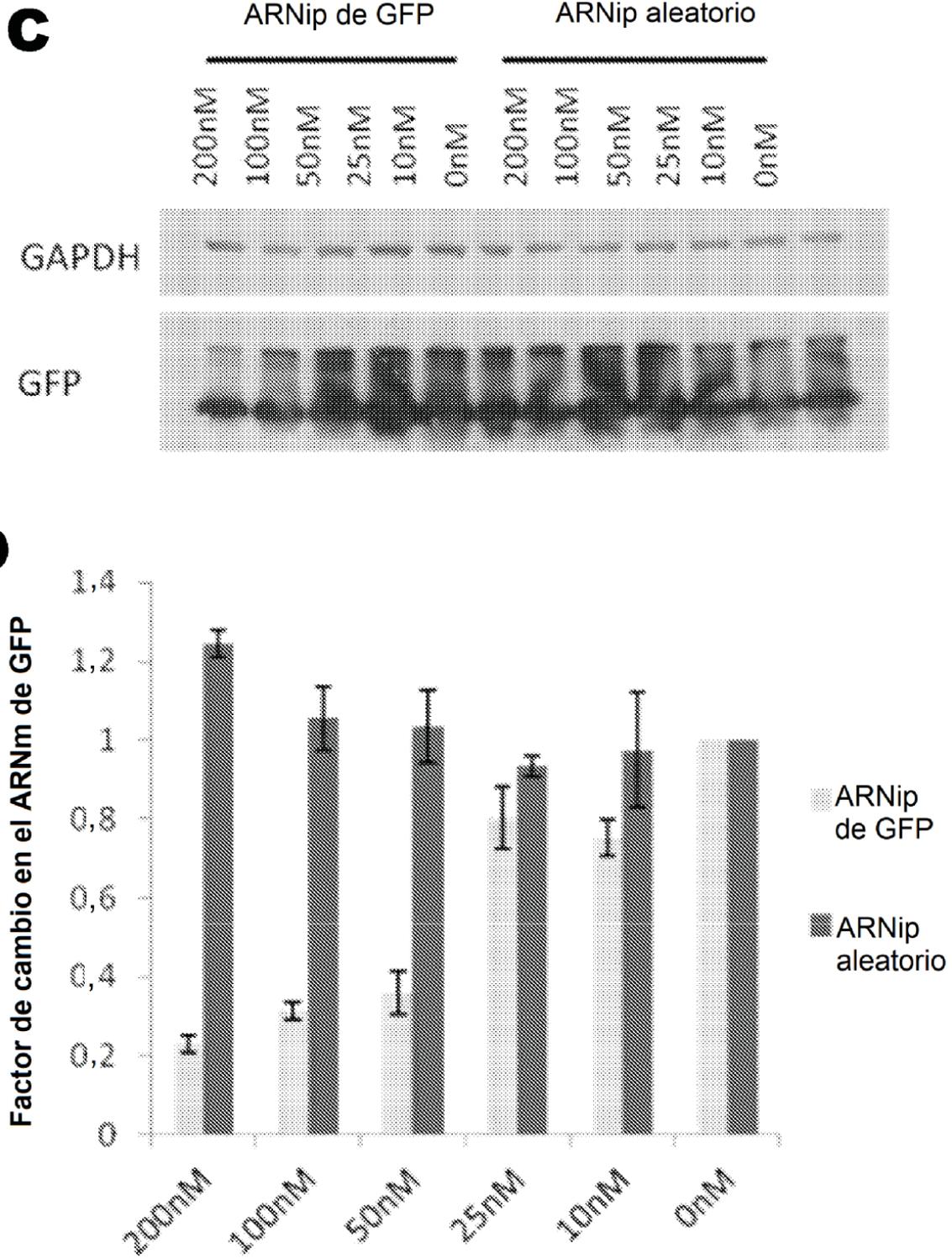
**FIG. 1B**



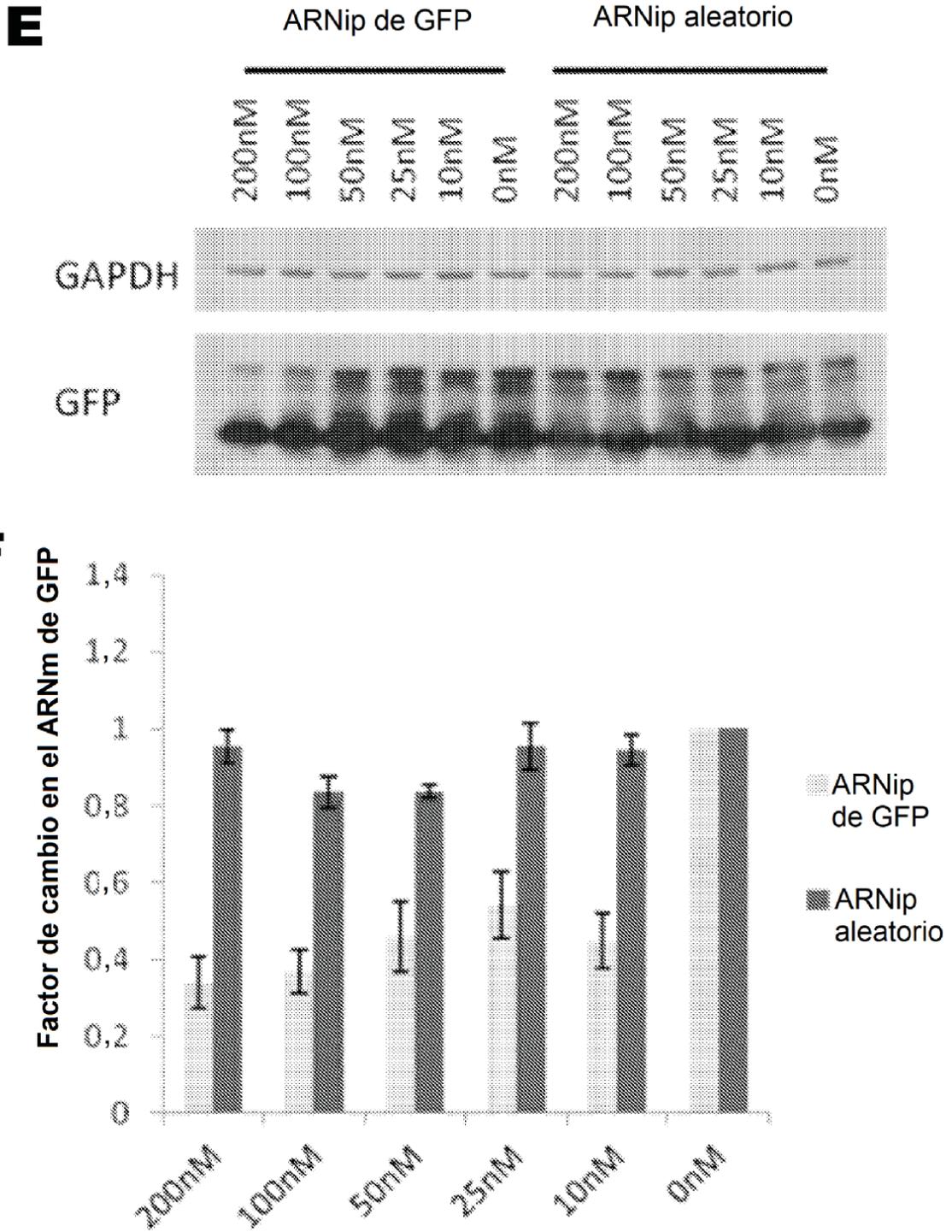
**FIG. 2**



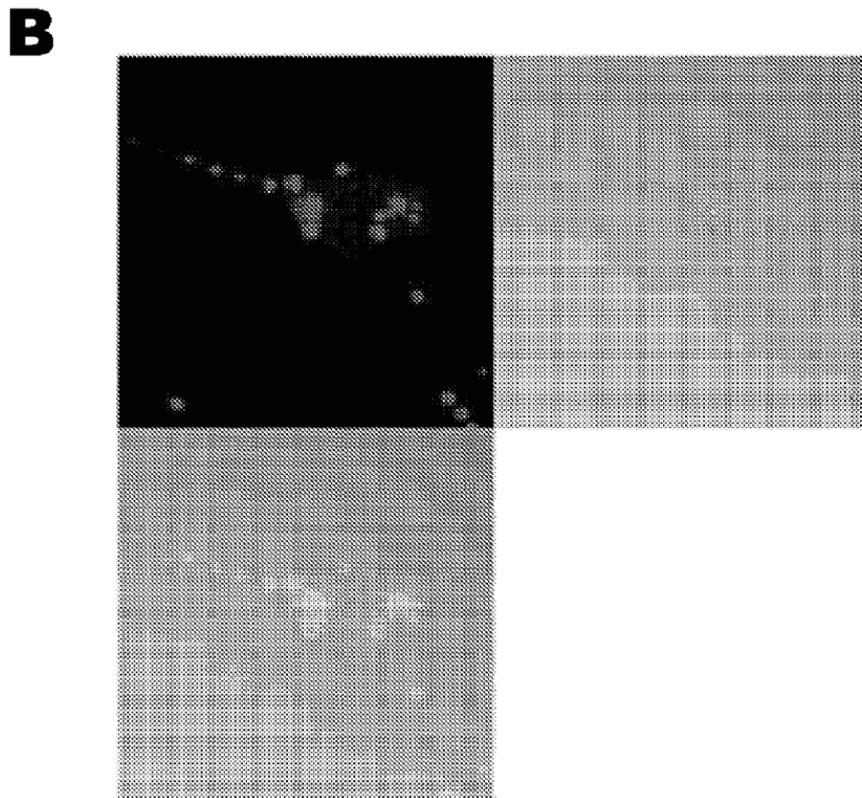
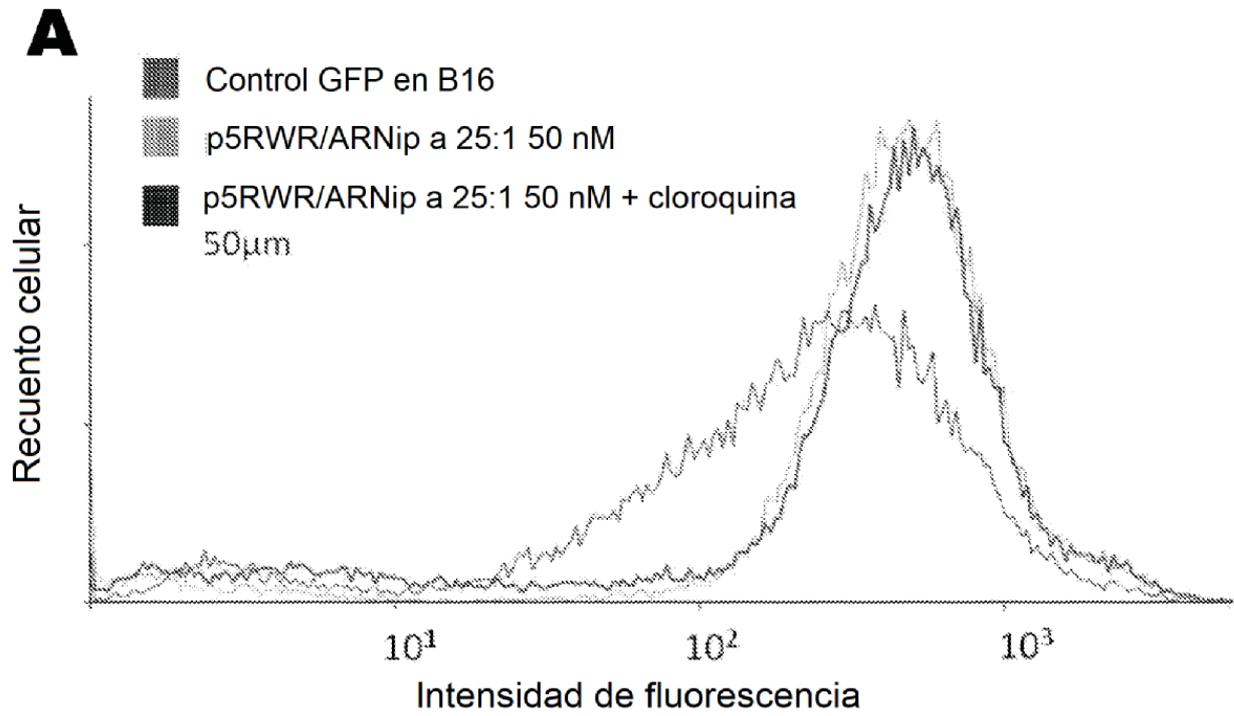
**FIG. 3**



**FIG. 3**

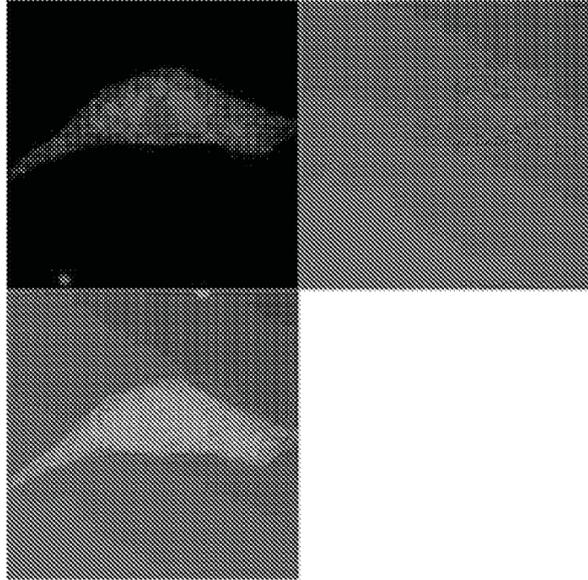


**FIG. 3**

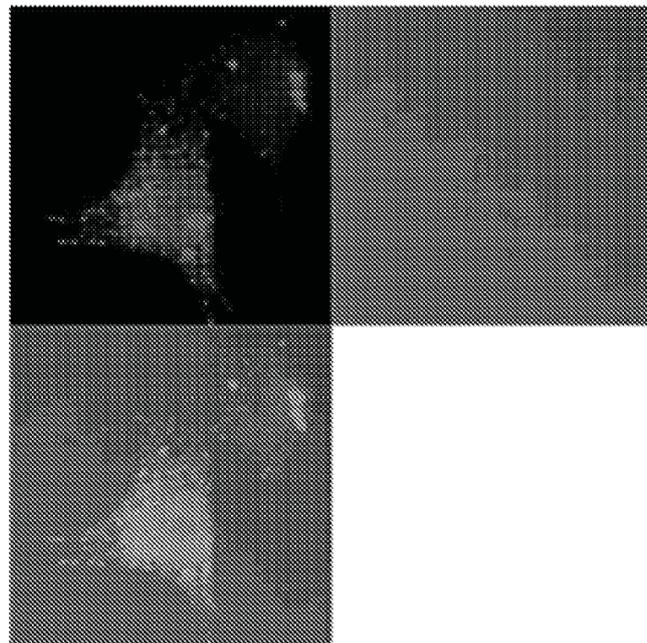


**FIG. 4**

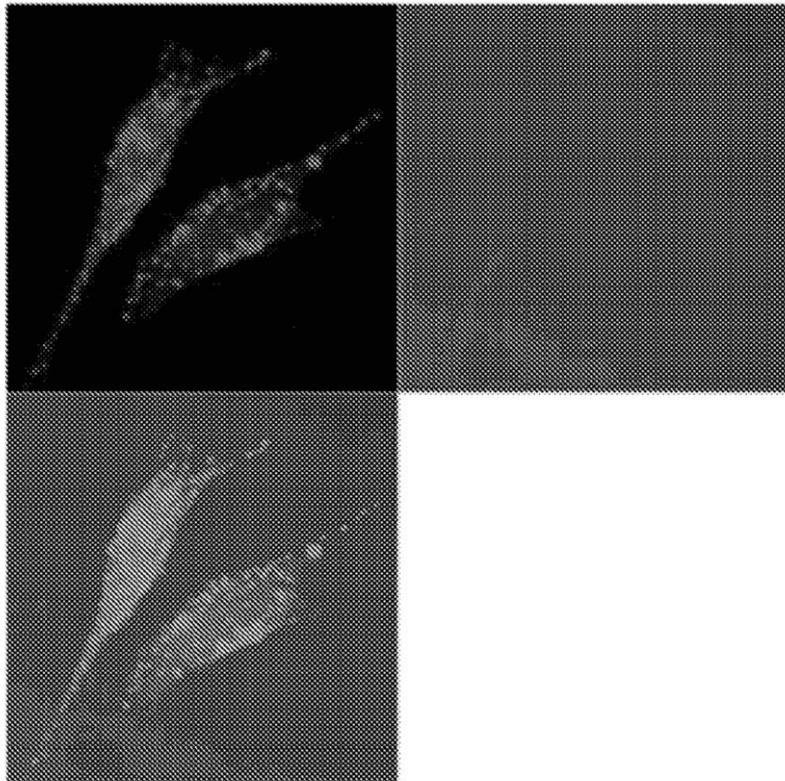
**C**



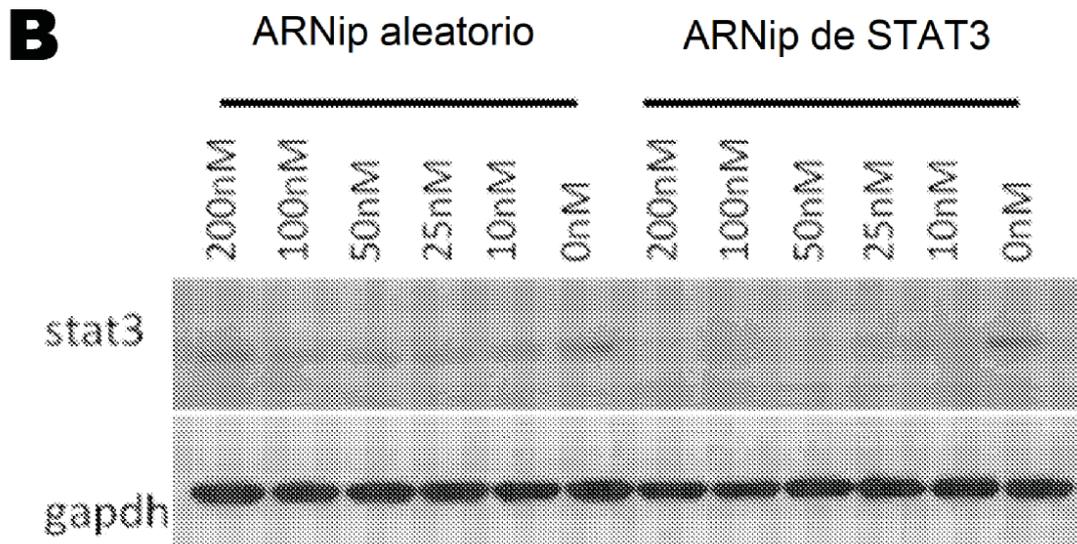
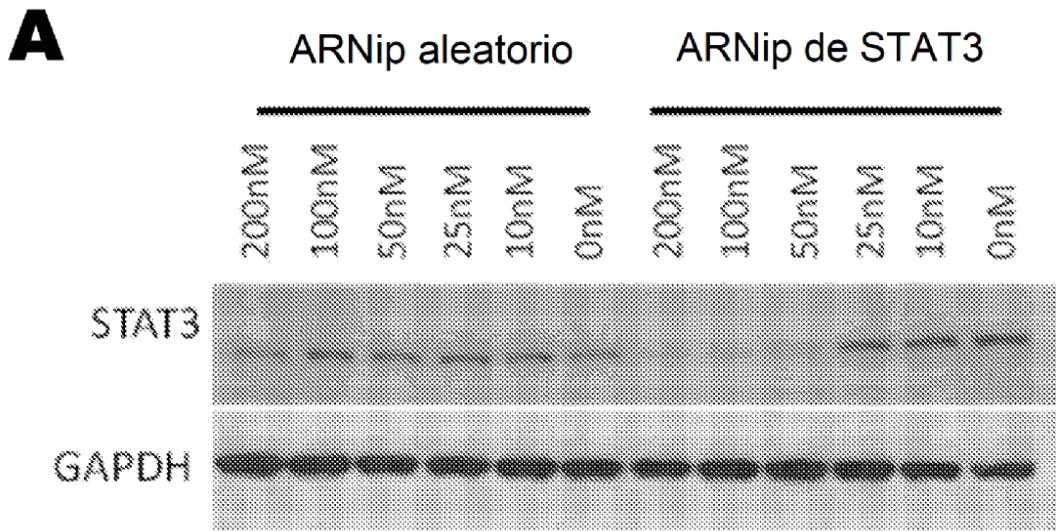
**D**



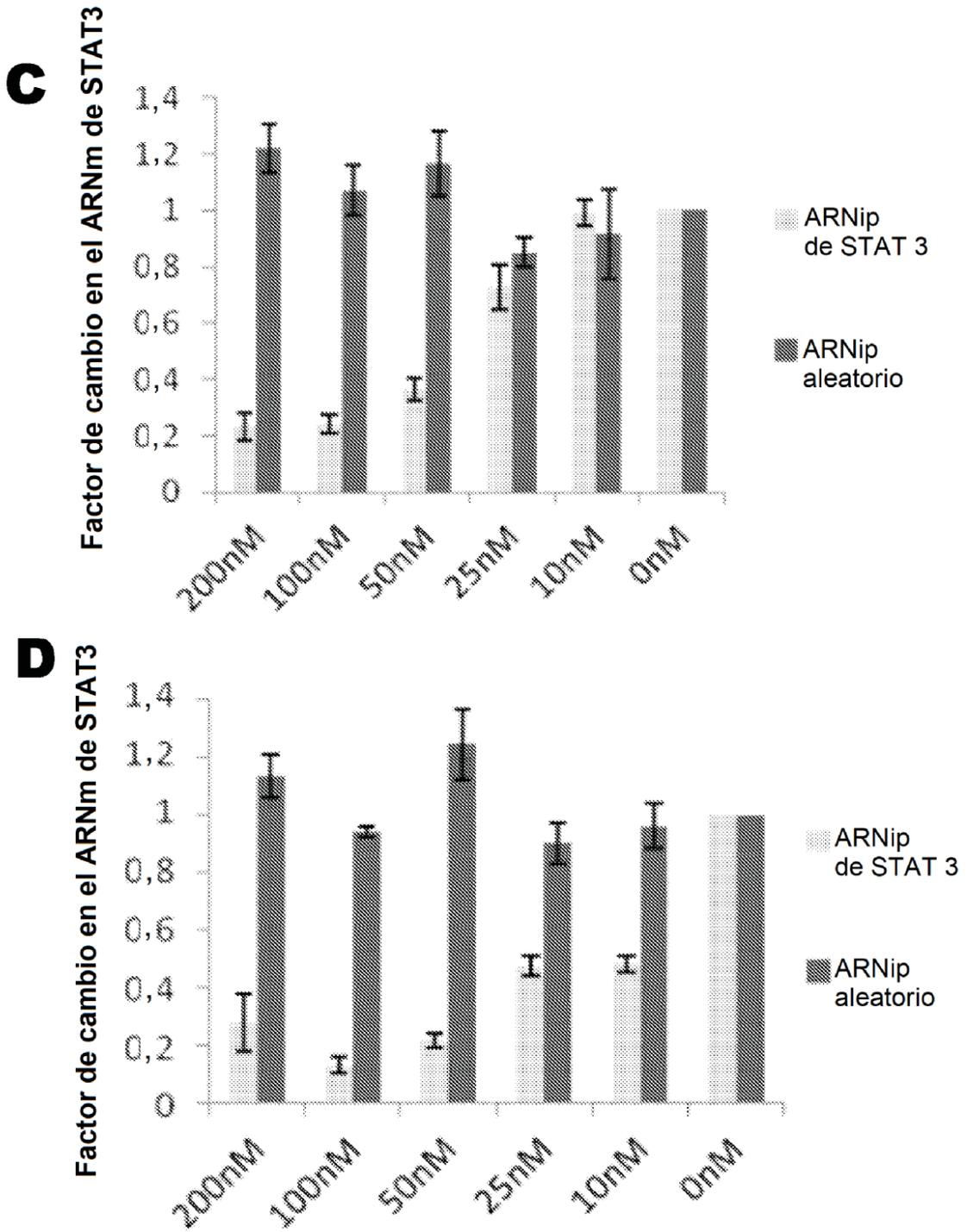
**FIG. 4**



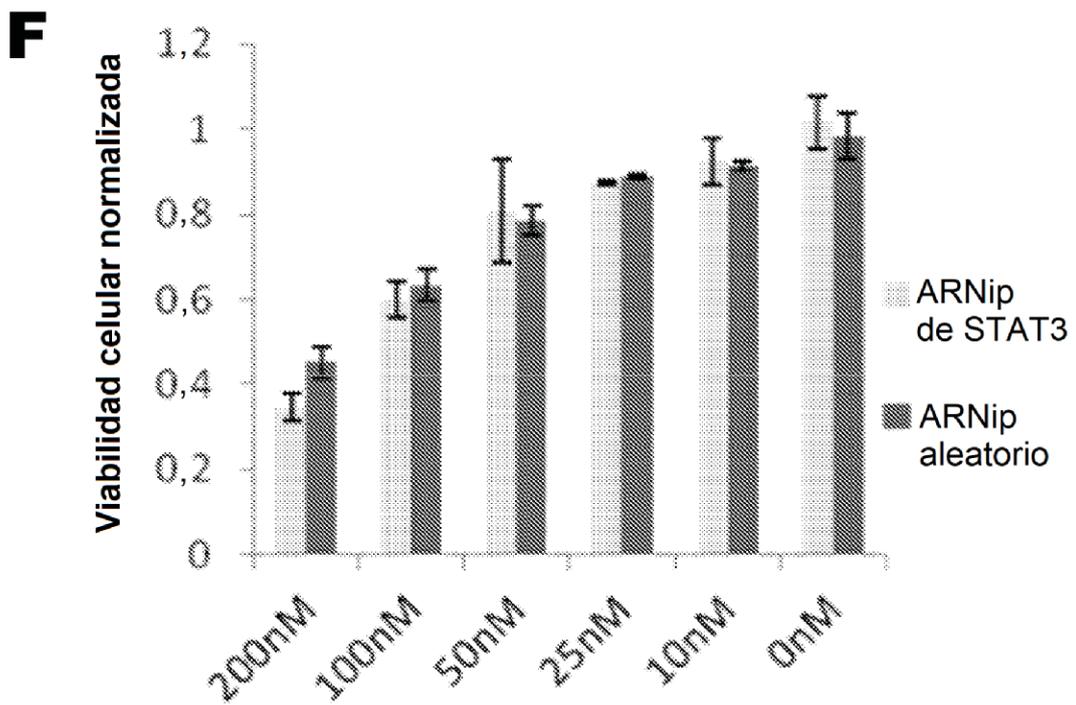
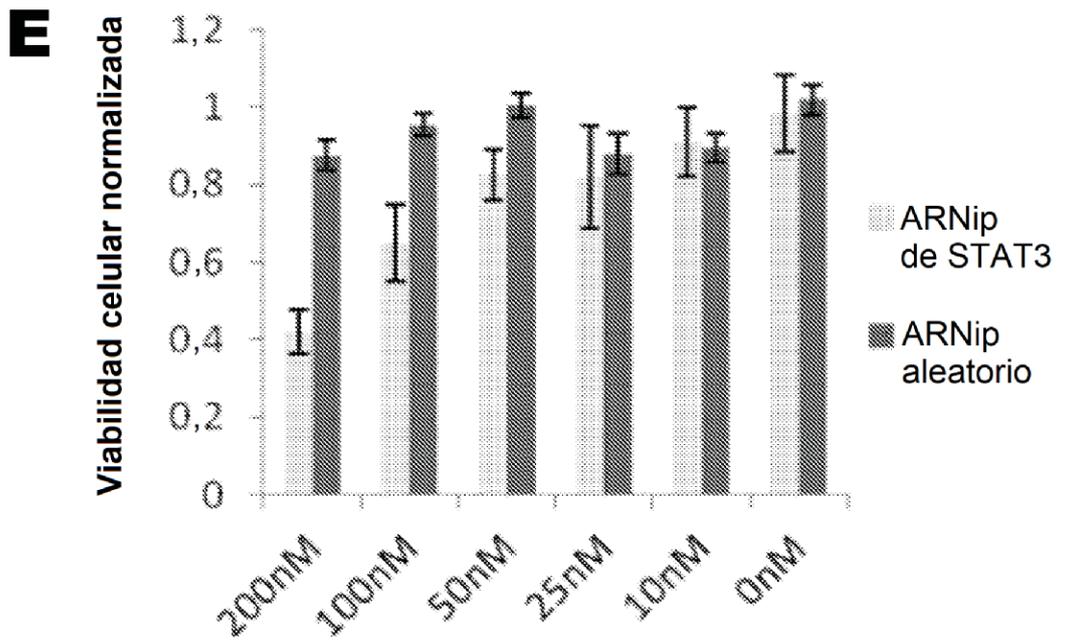
**FIG. 4E**



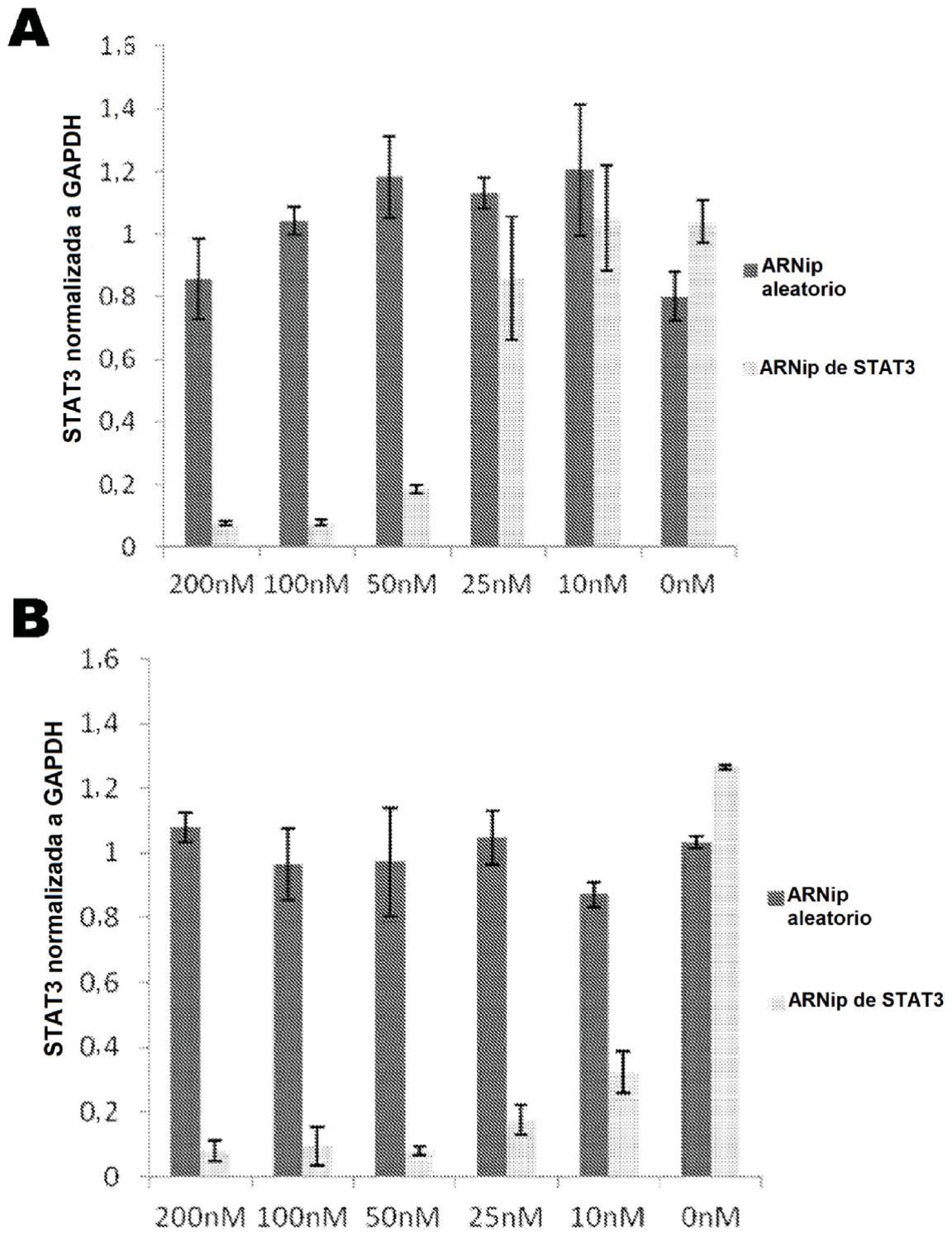
**FIG. 5**



**FIG. 5**

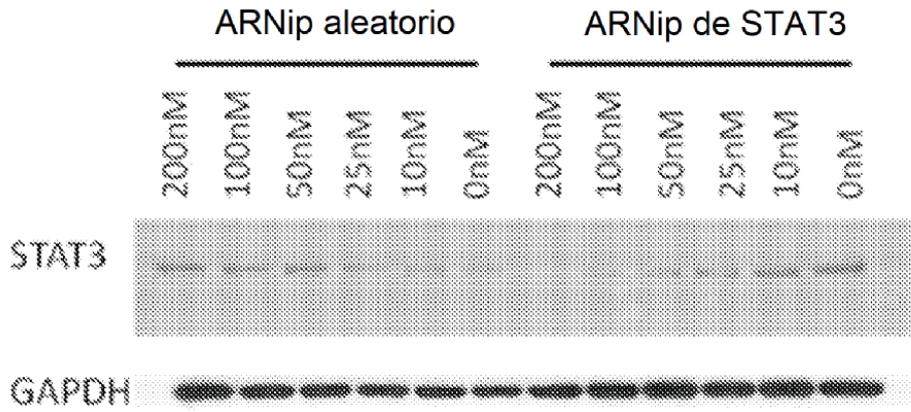


**FIG. 5**

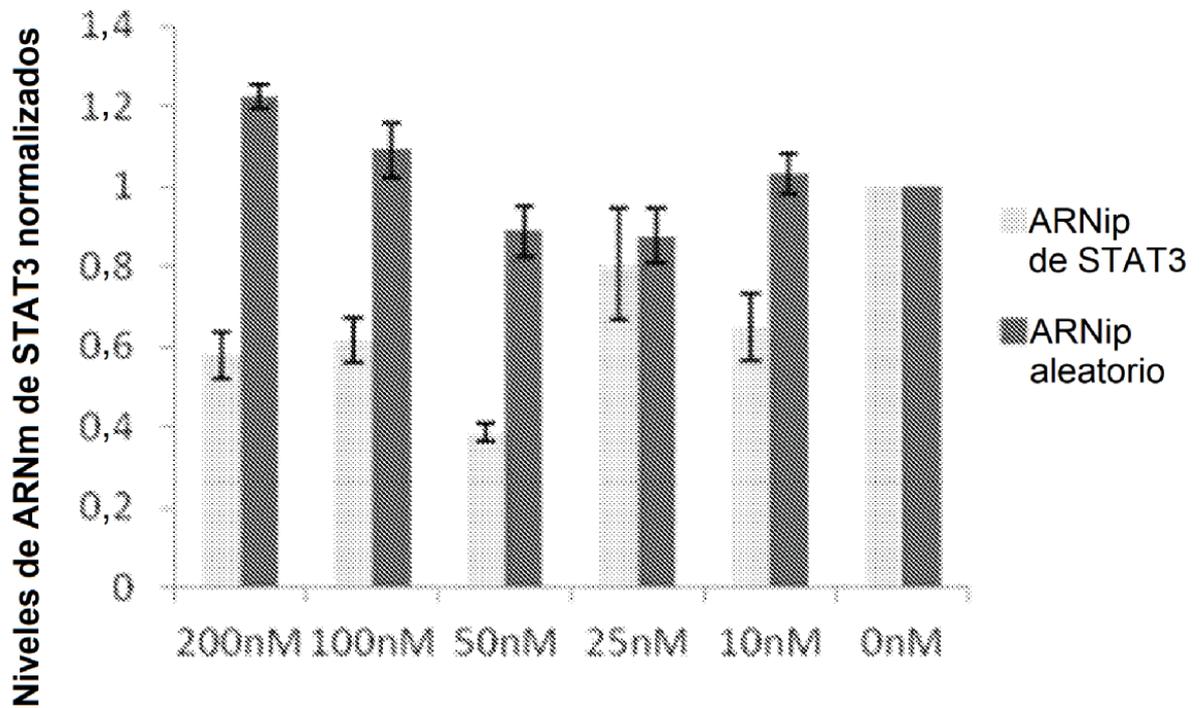


**FIG. 6**

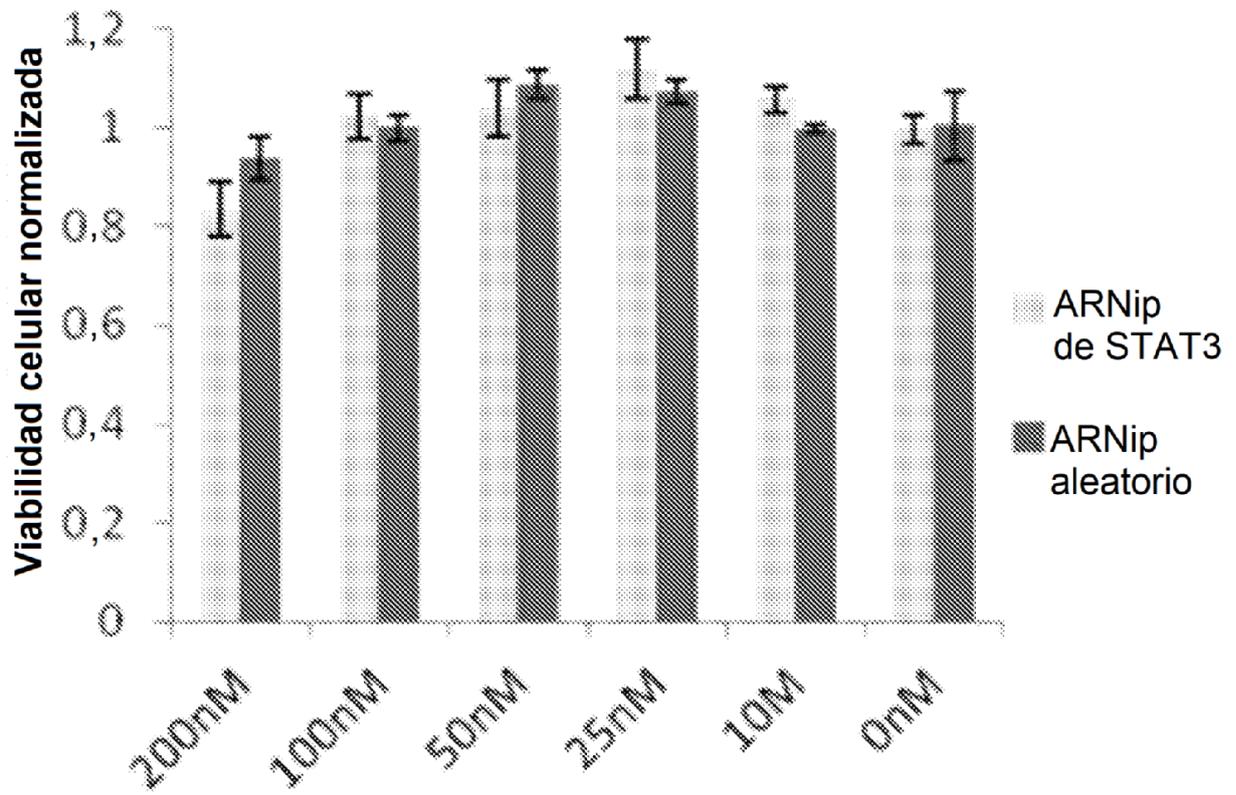
**A**



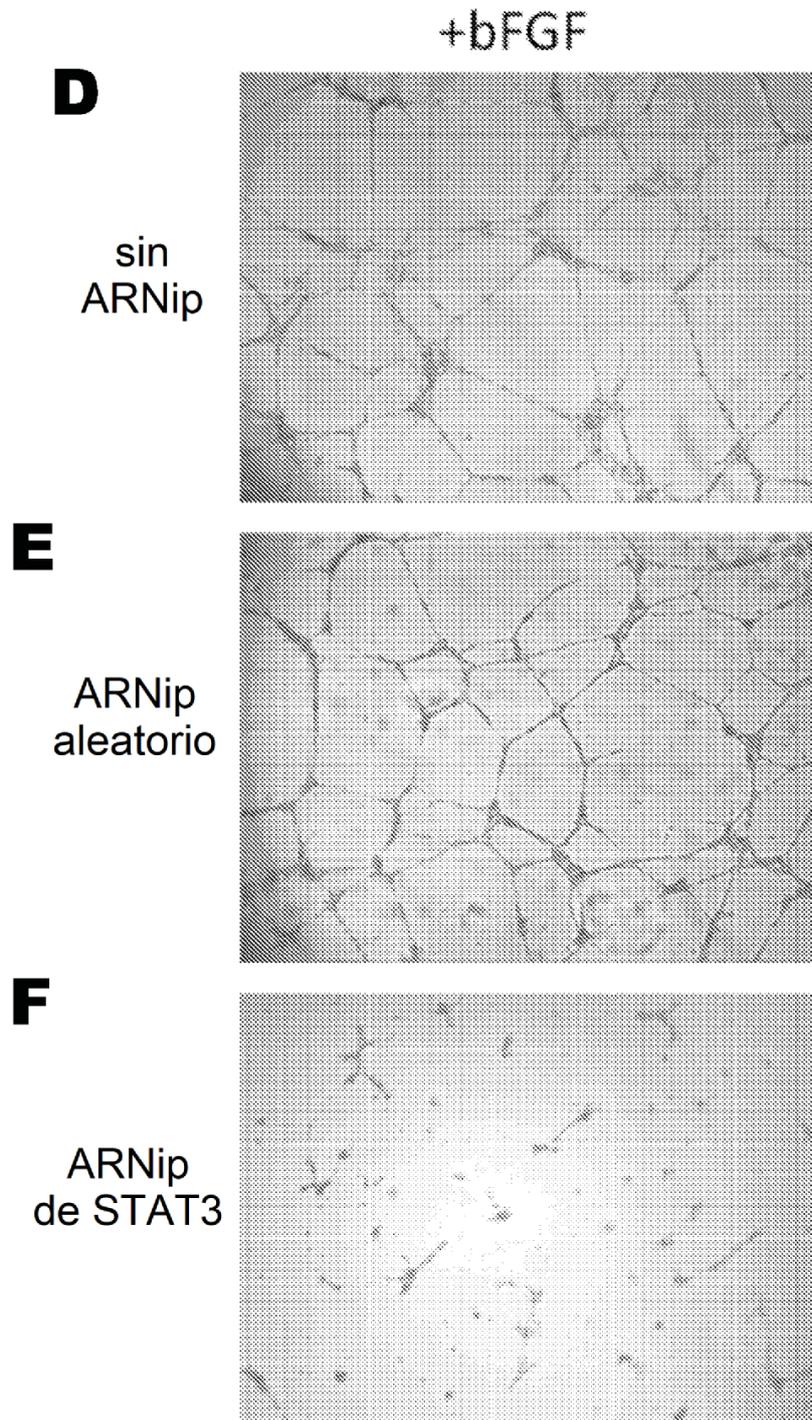
**B**



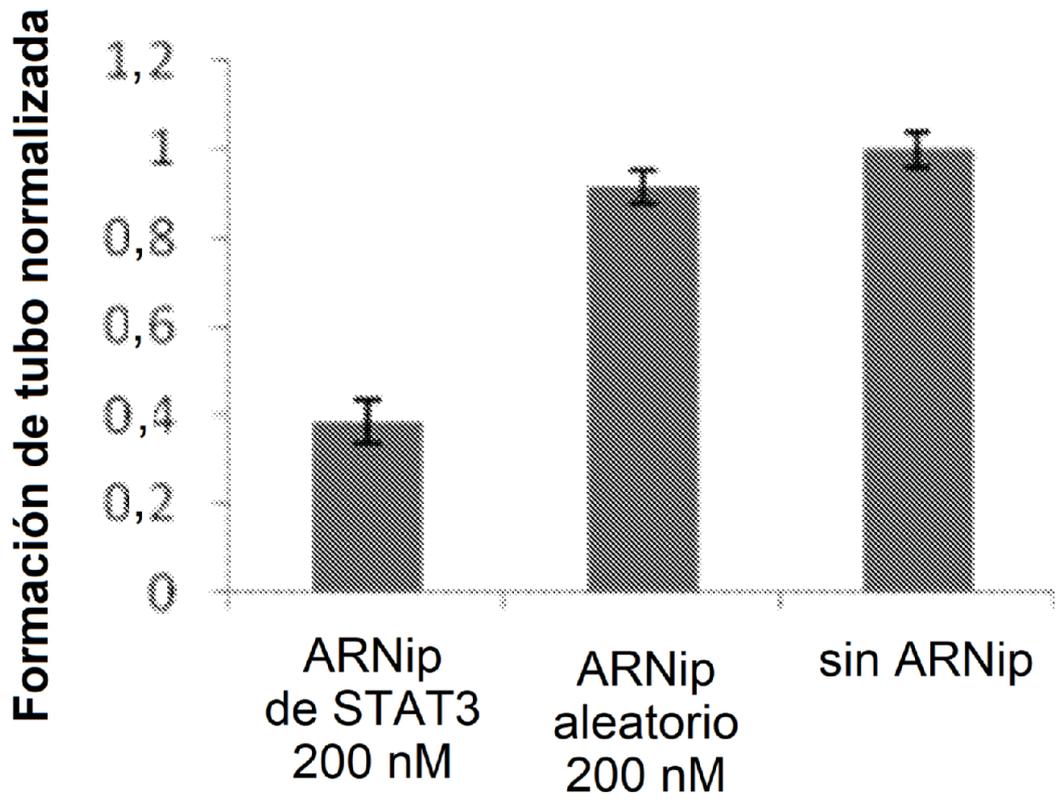
**FIG. 7**



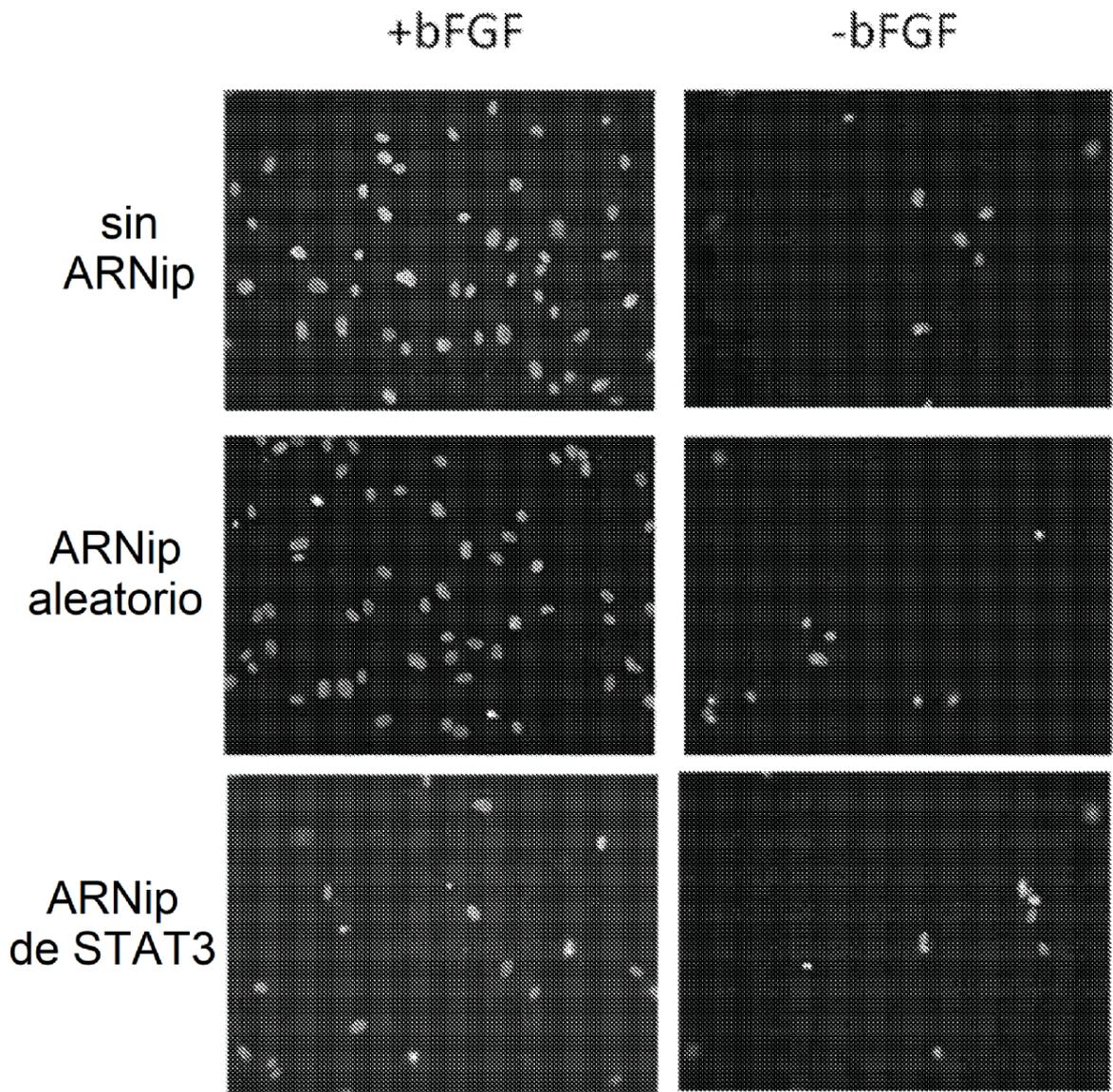
**FIG. 7C**



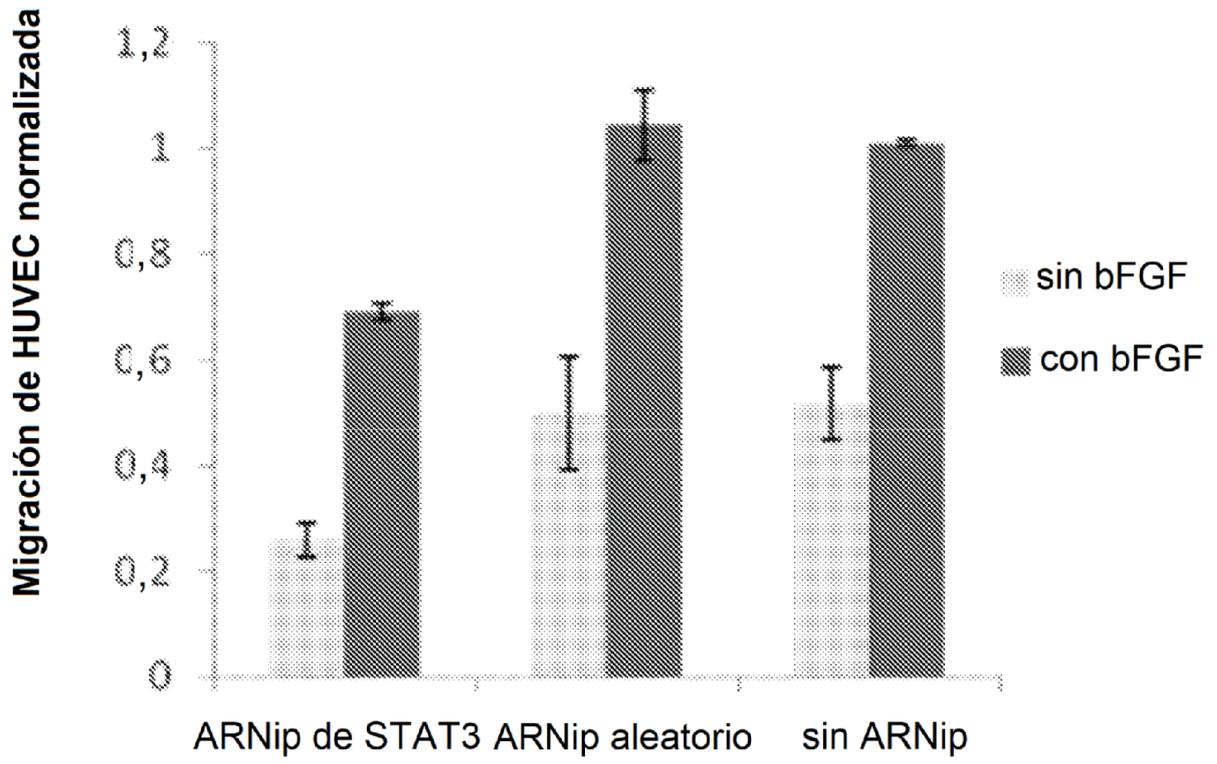
**FIG. 7**



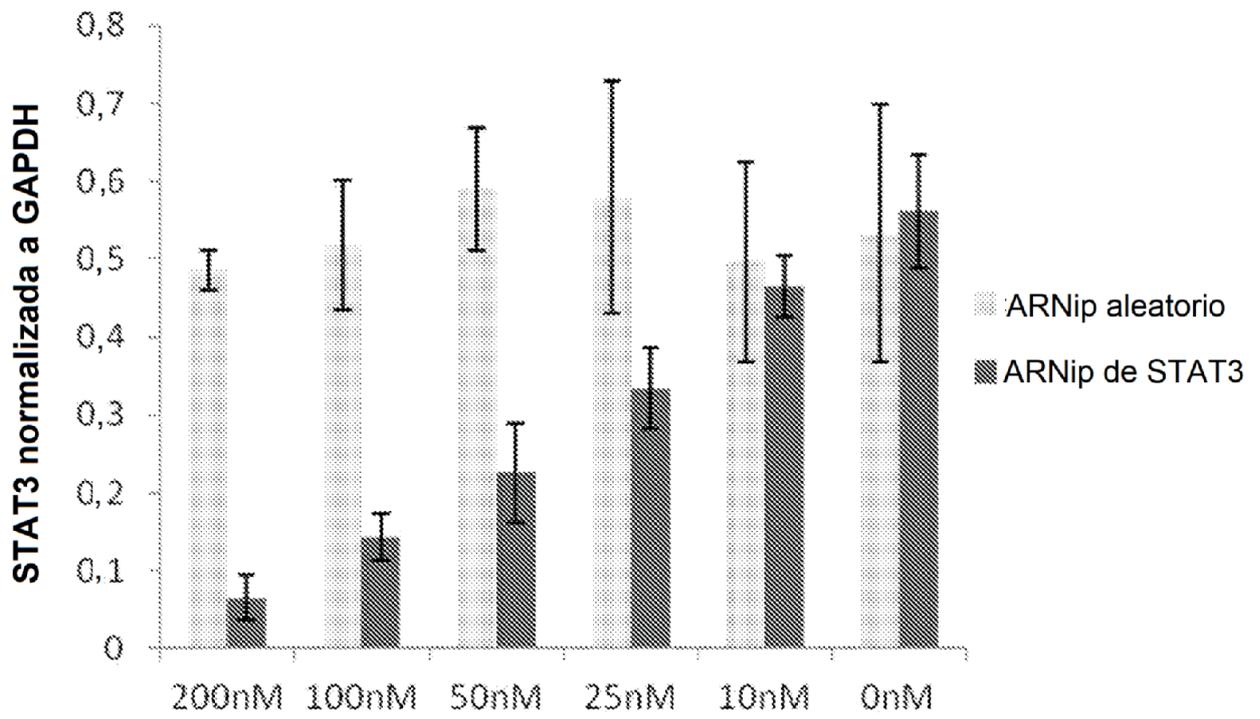
**FIG. 7G**



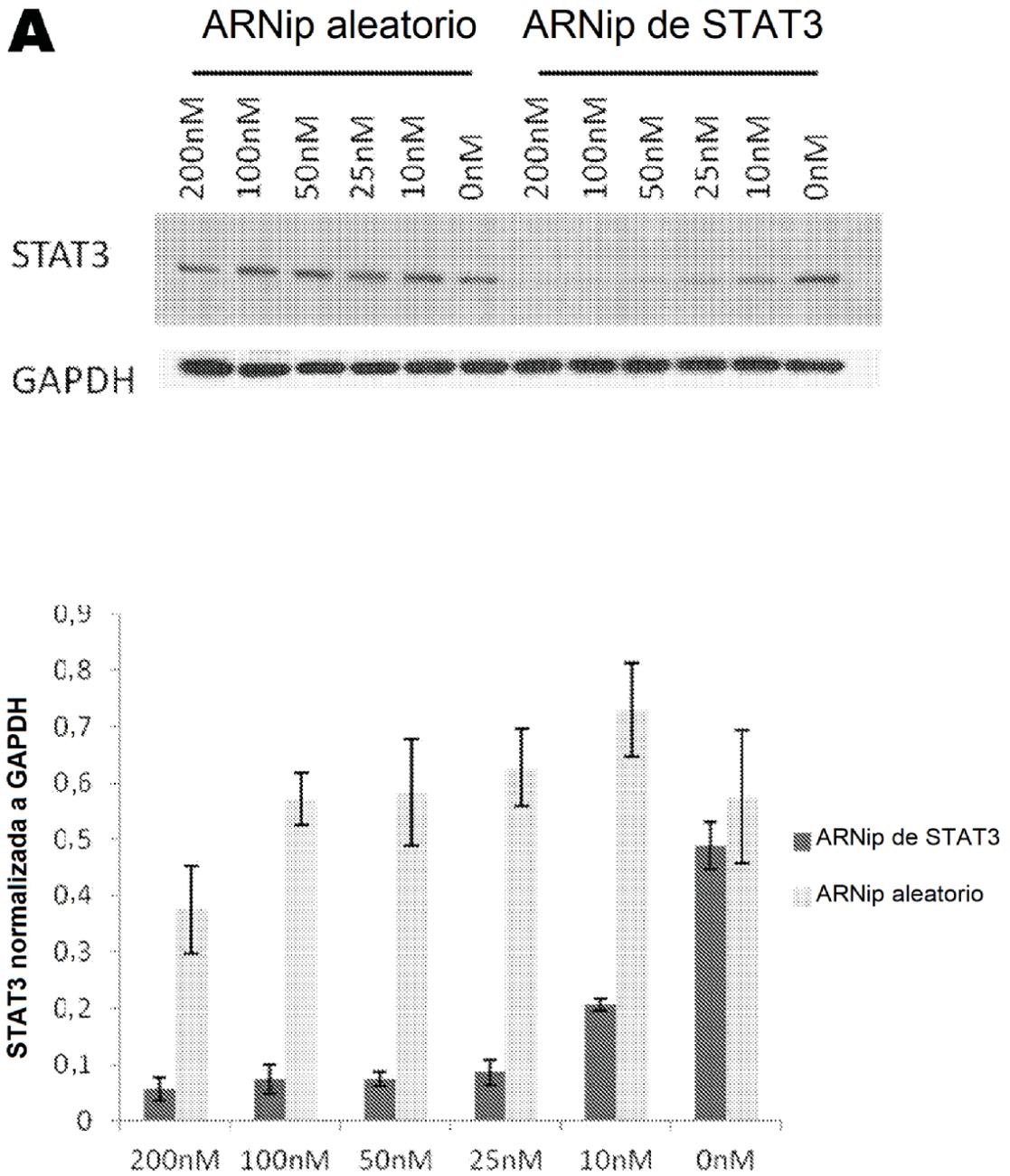
**FIG. 7H**



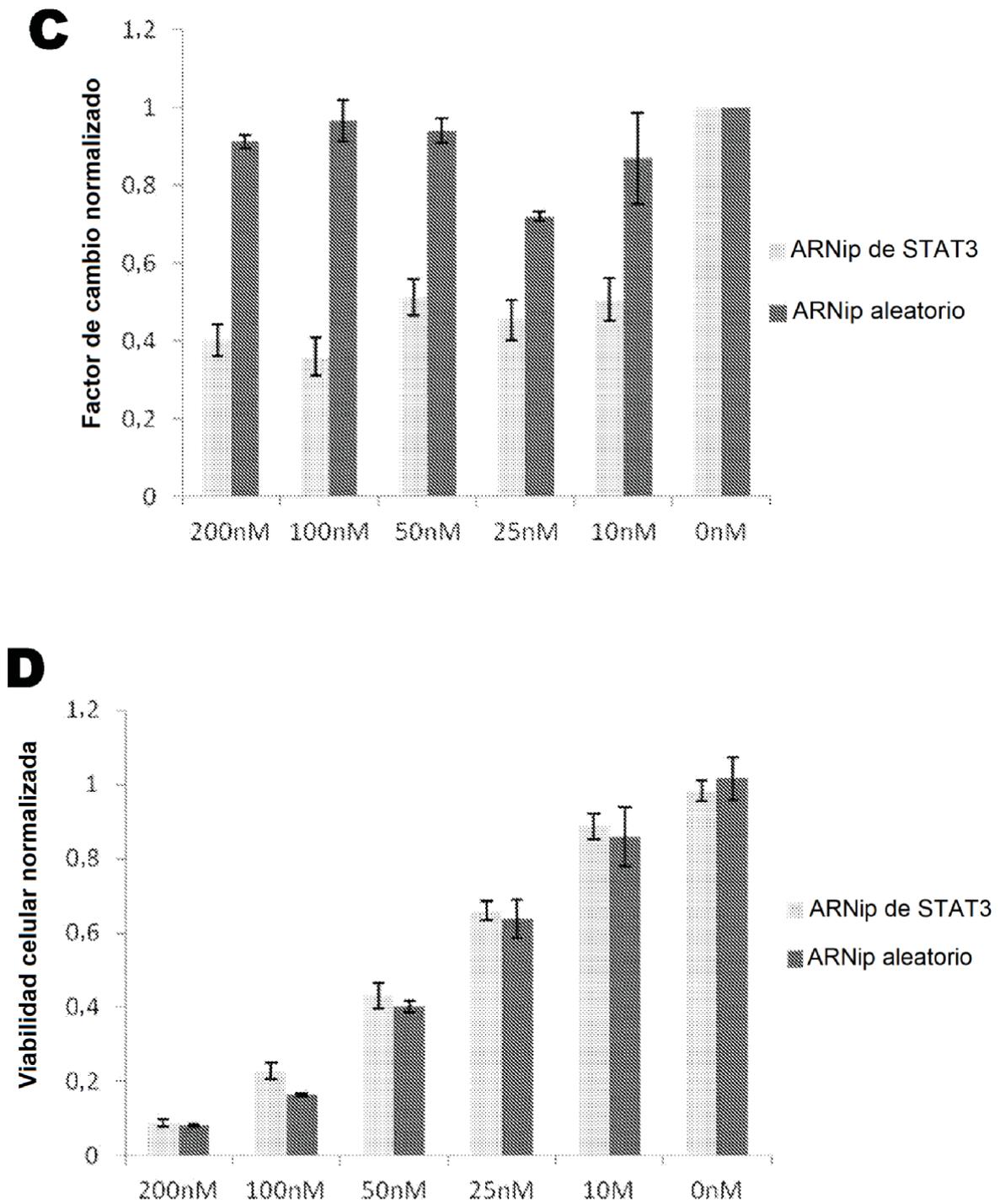
**FIG. 7I**



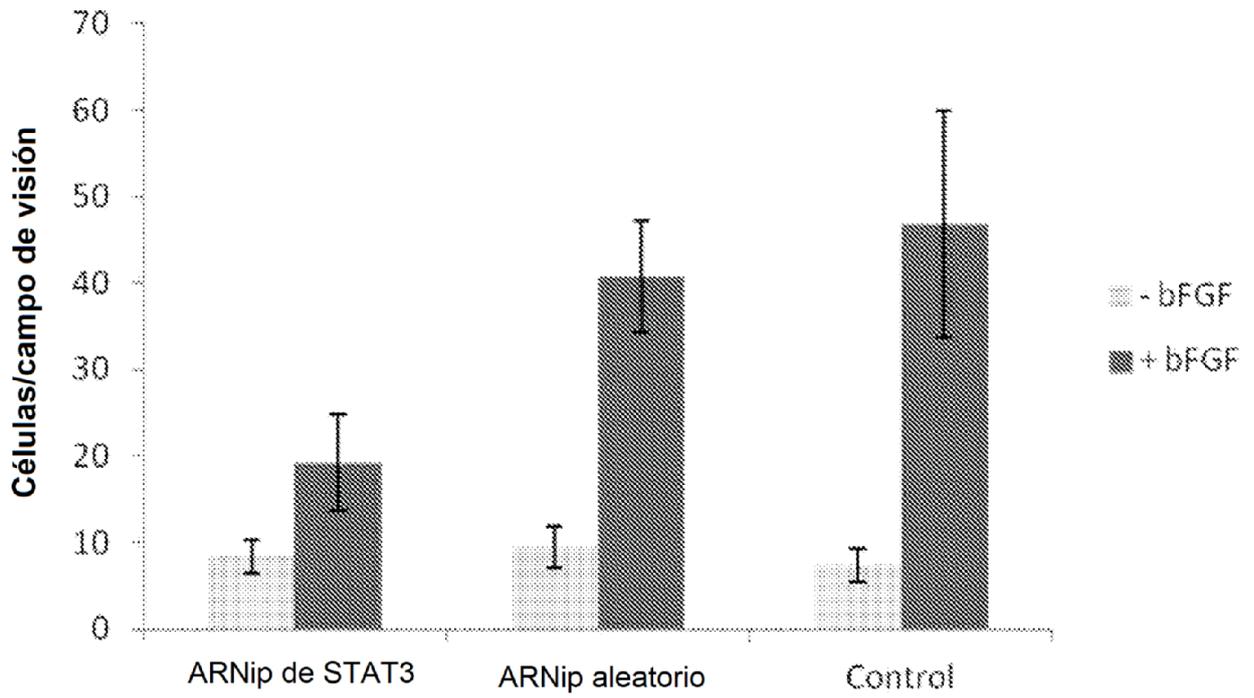
**FIG. 8**



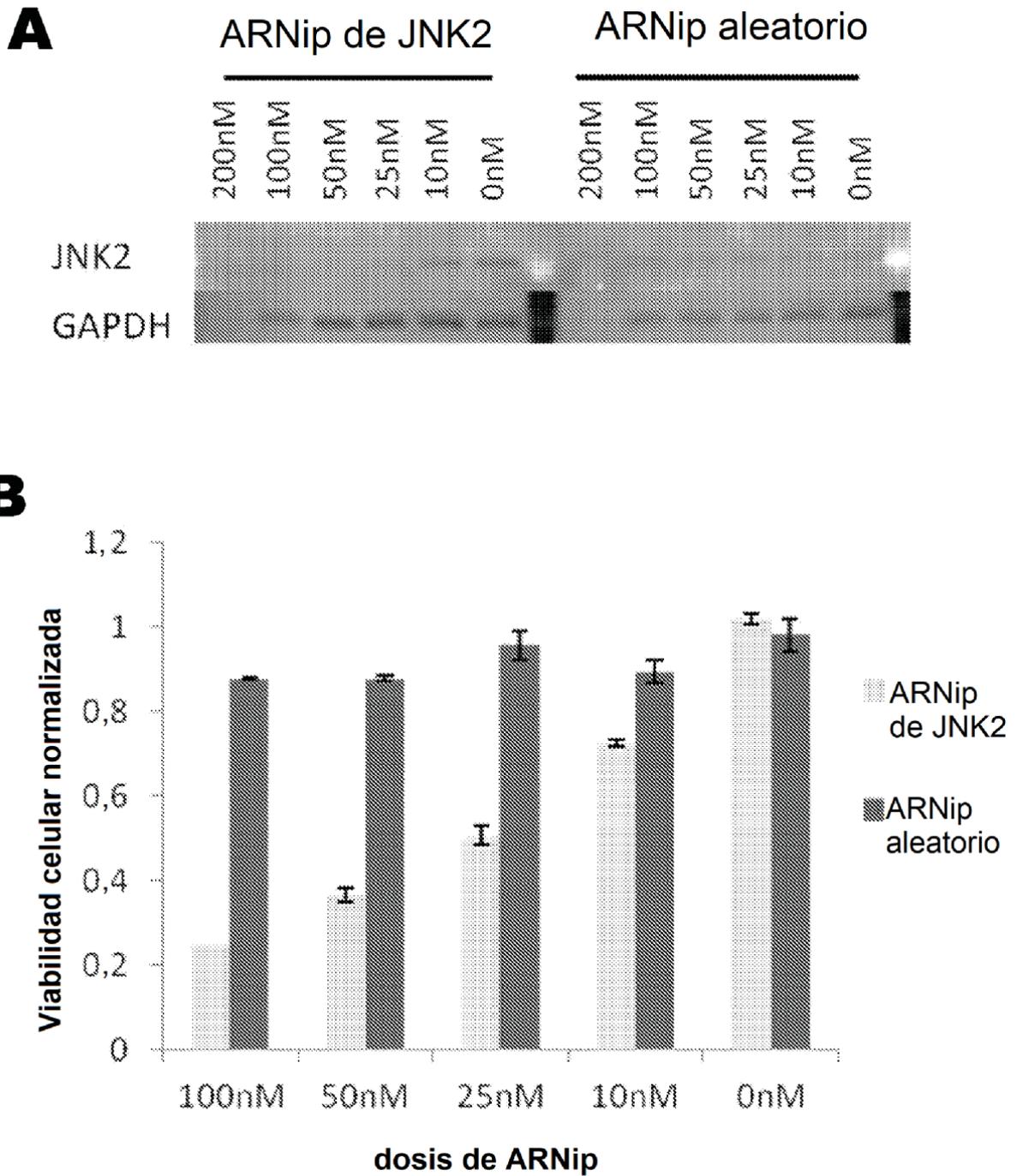
**FIG. 9**



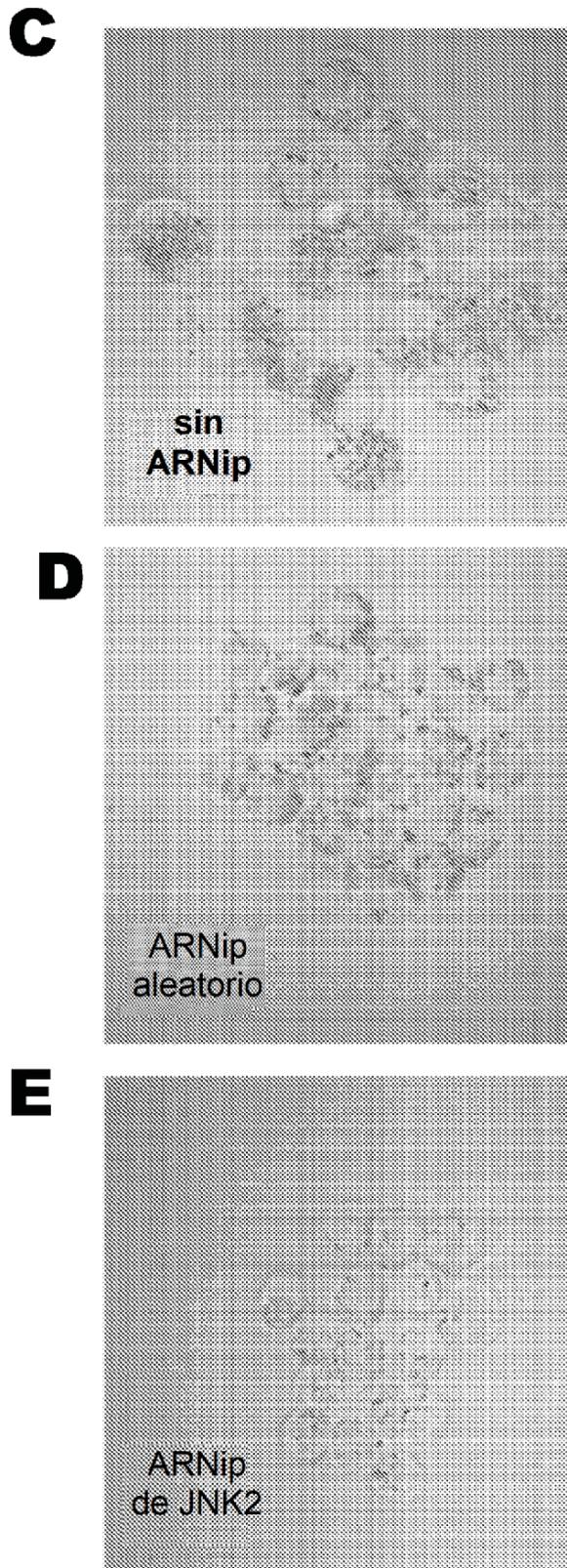
**FIG. 9**



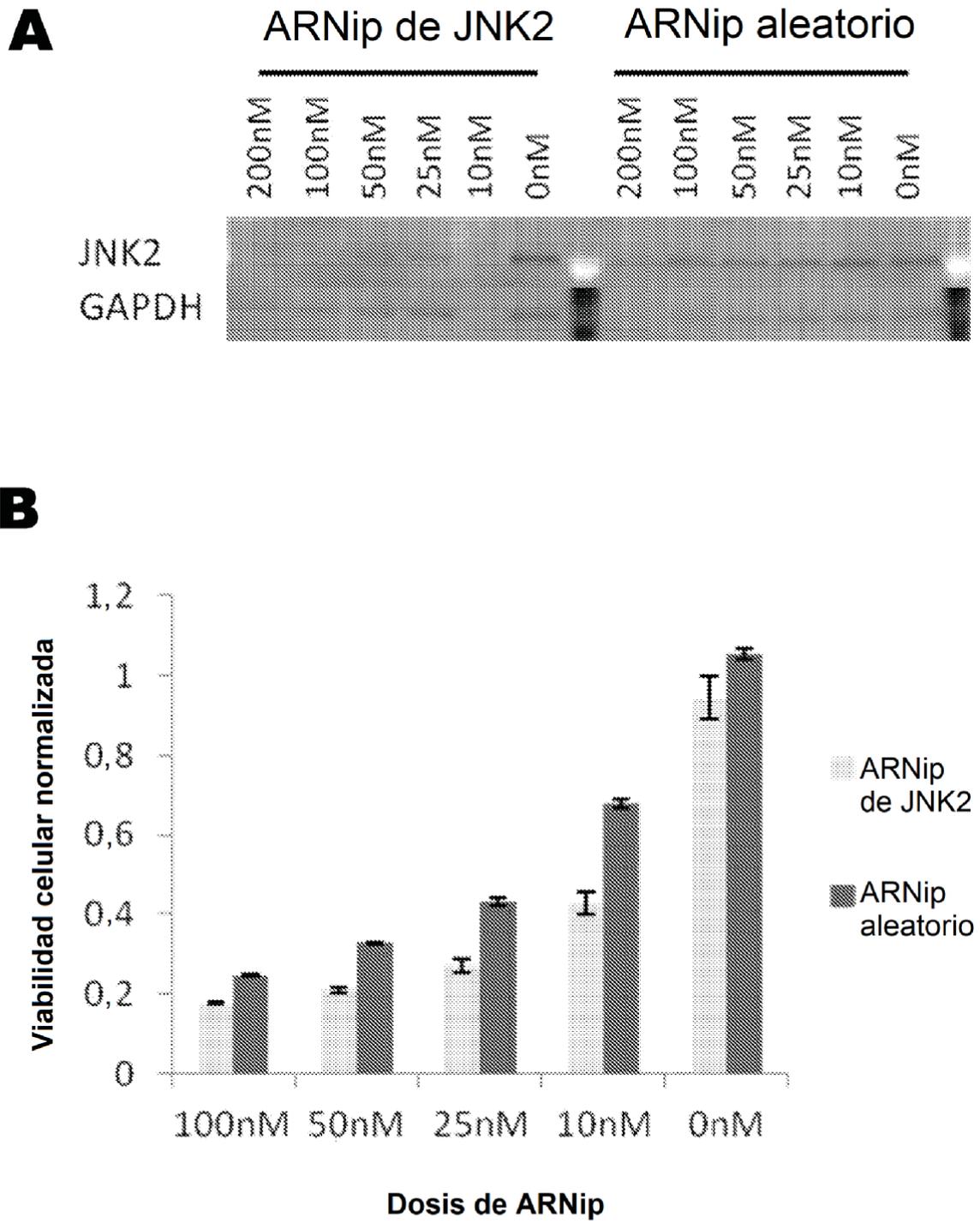
**FIG. 10**



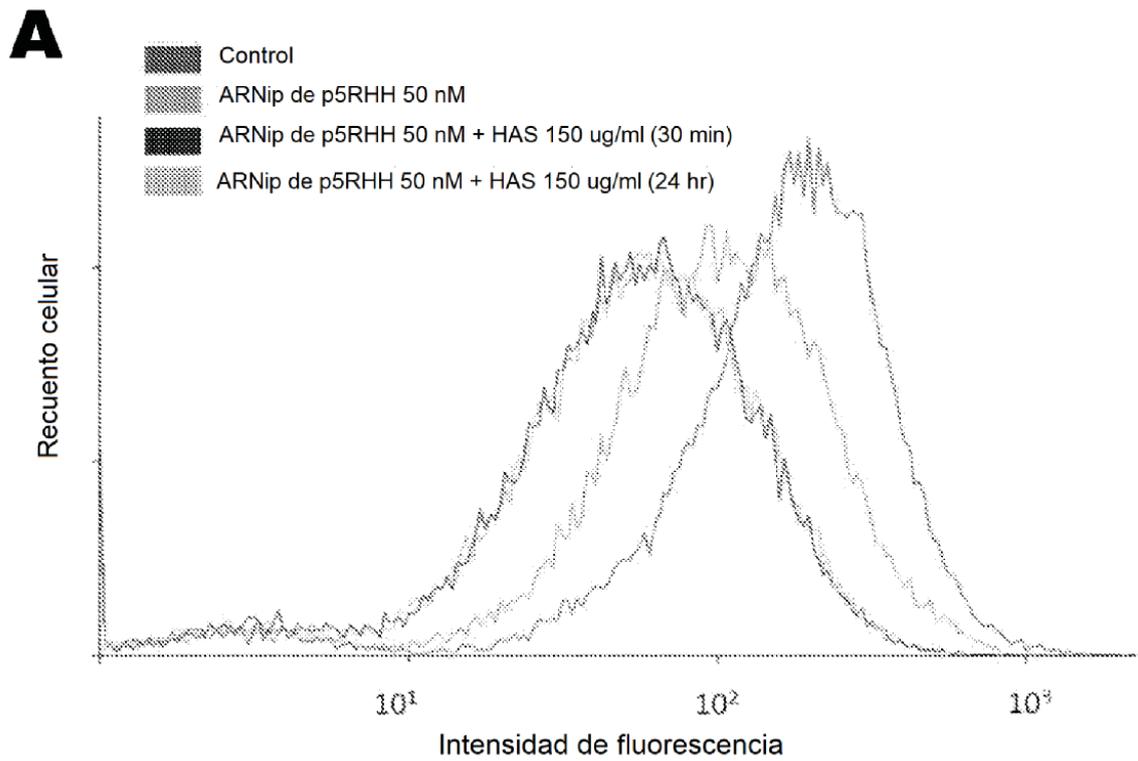
**FIG. 11**



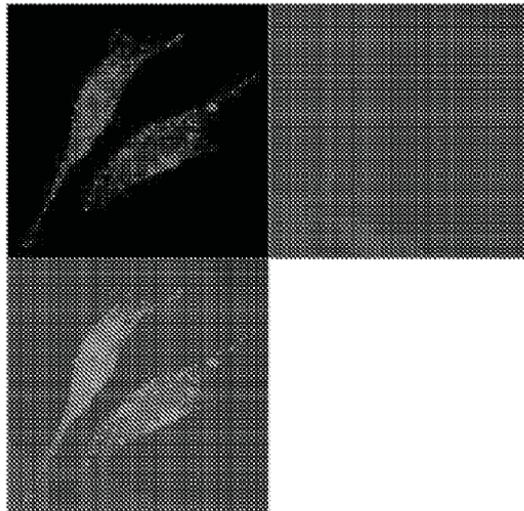
**FIG. 11**



**FIG. 12**

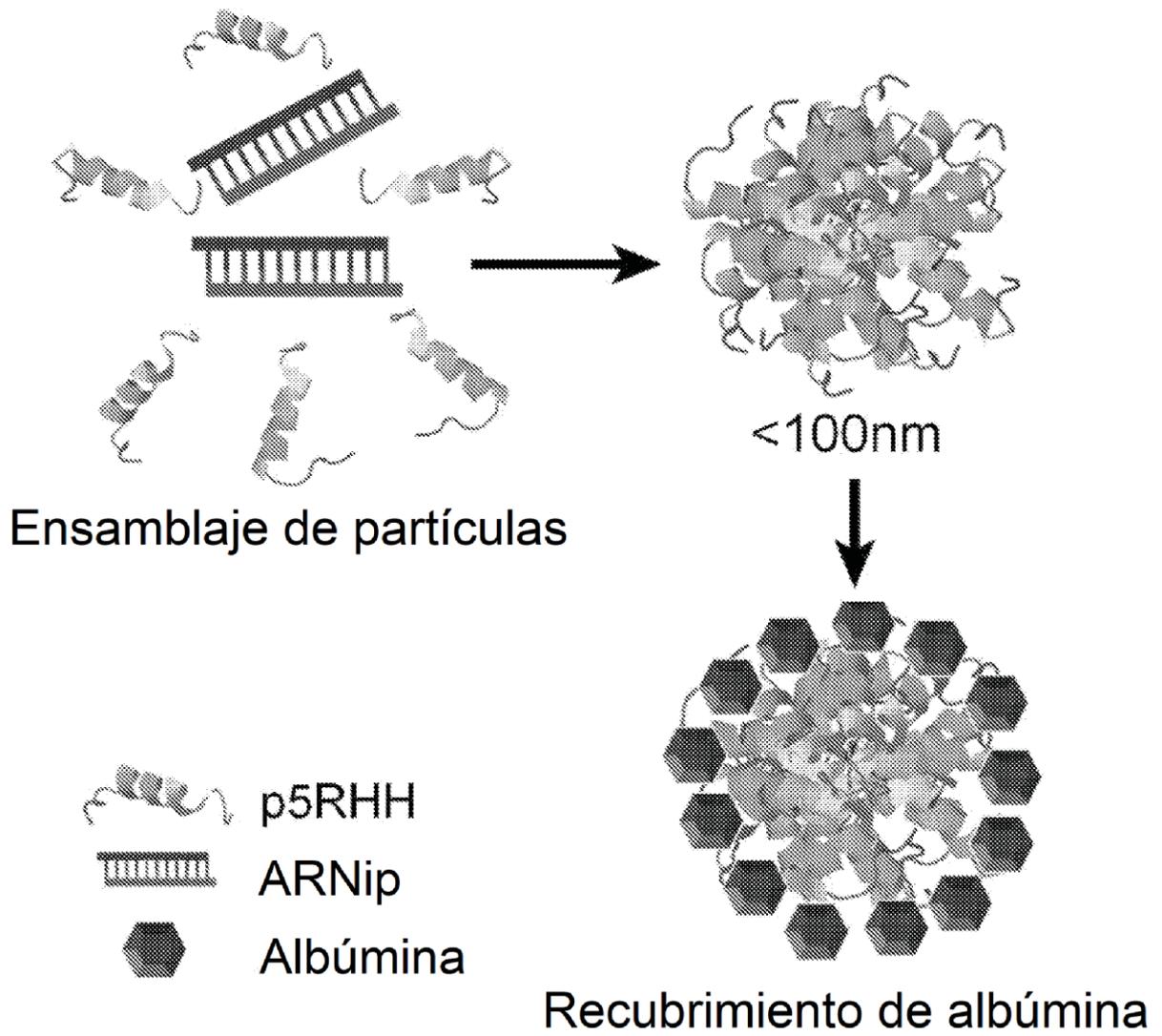


**B** ADNbc 100 nM a 100:1 p5RHH:ARNip

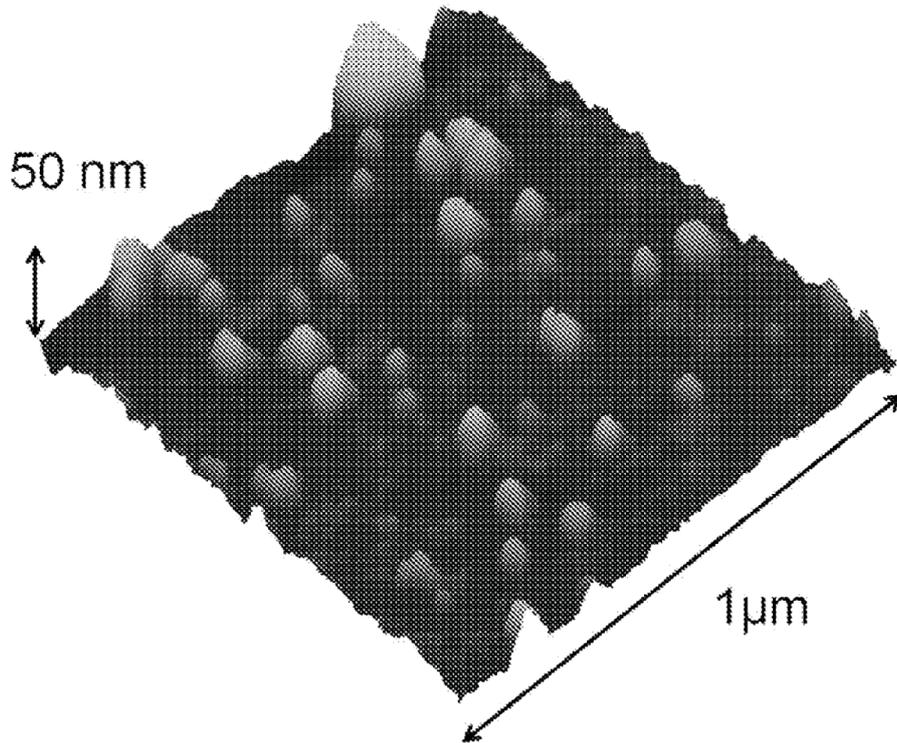


Medios completos - suero al 10 %

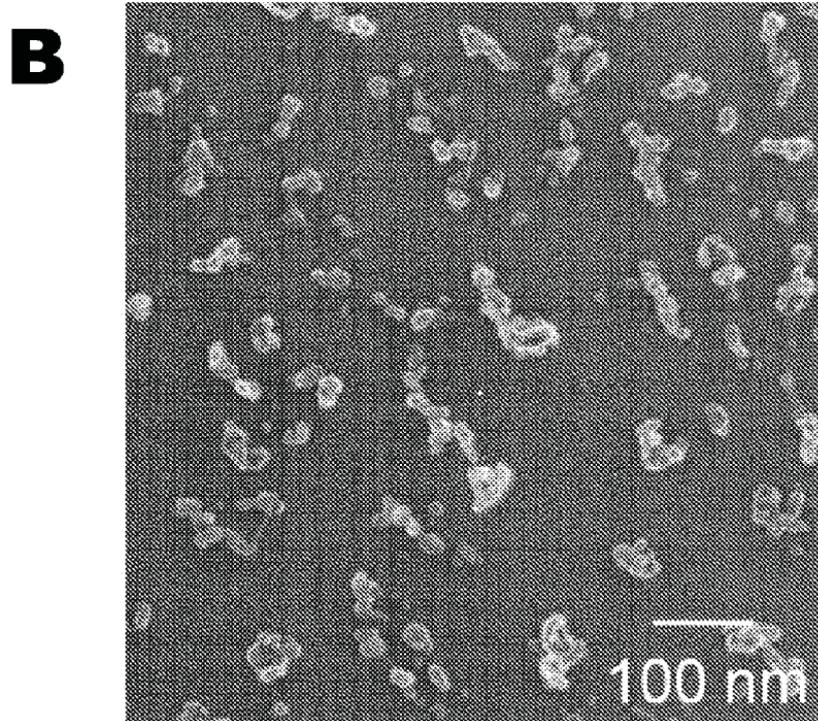
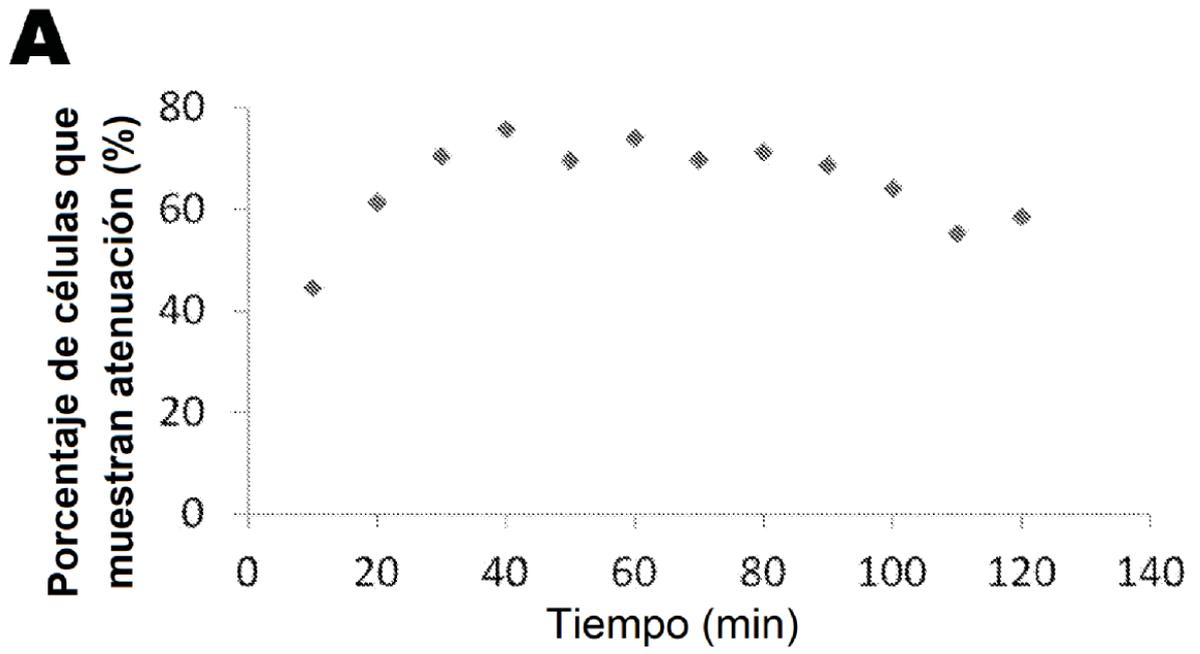
**FIG. 13**



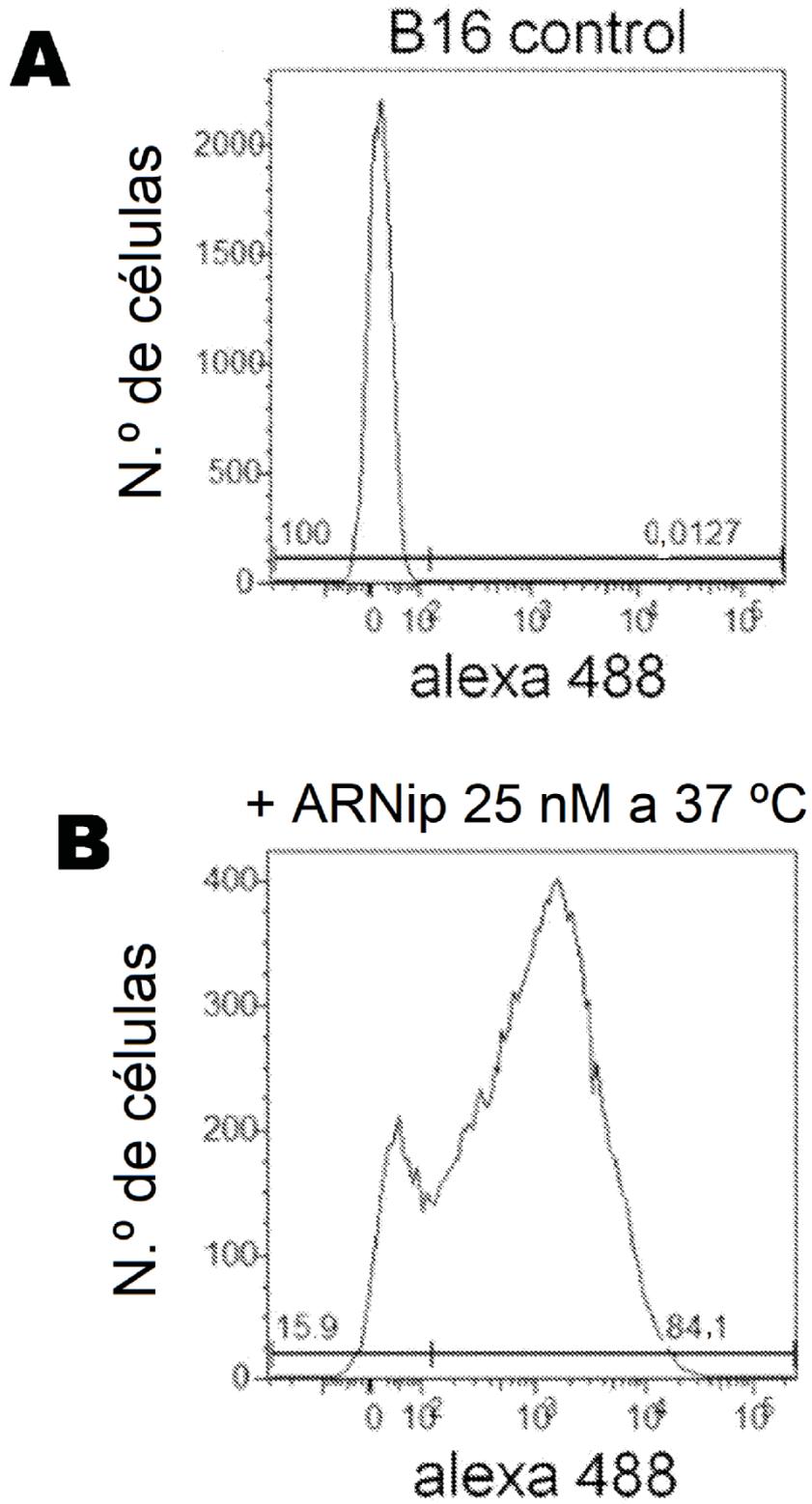
**FIG. 14A**



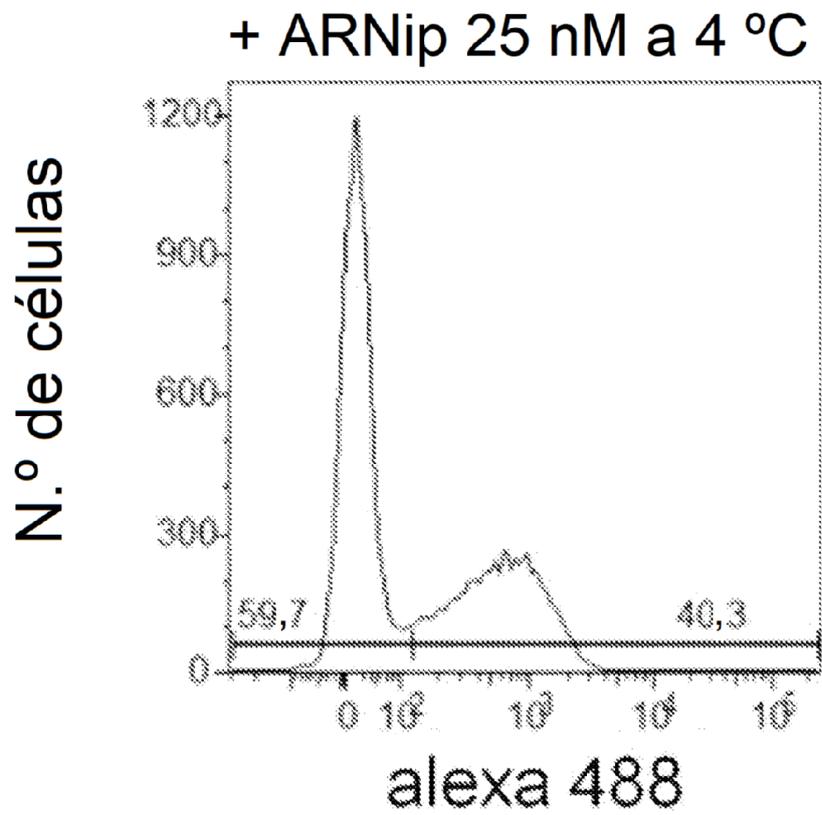
**FIG. 14B**



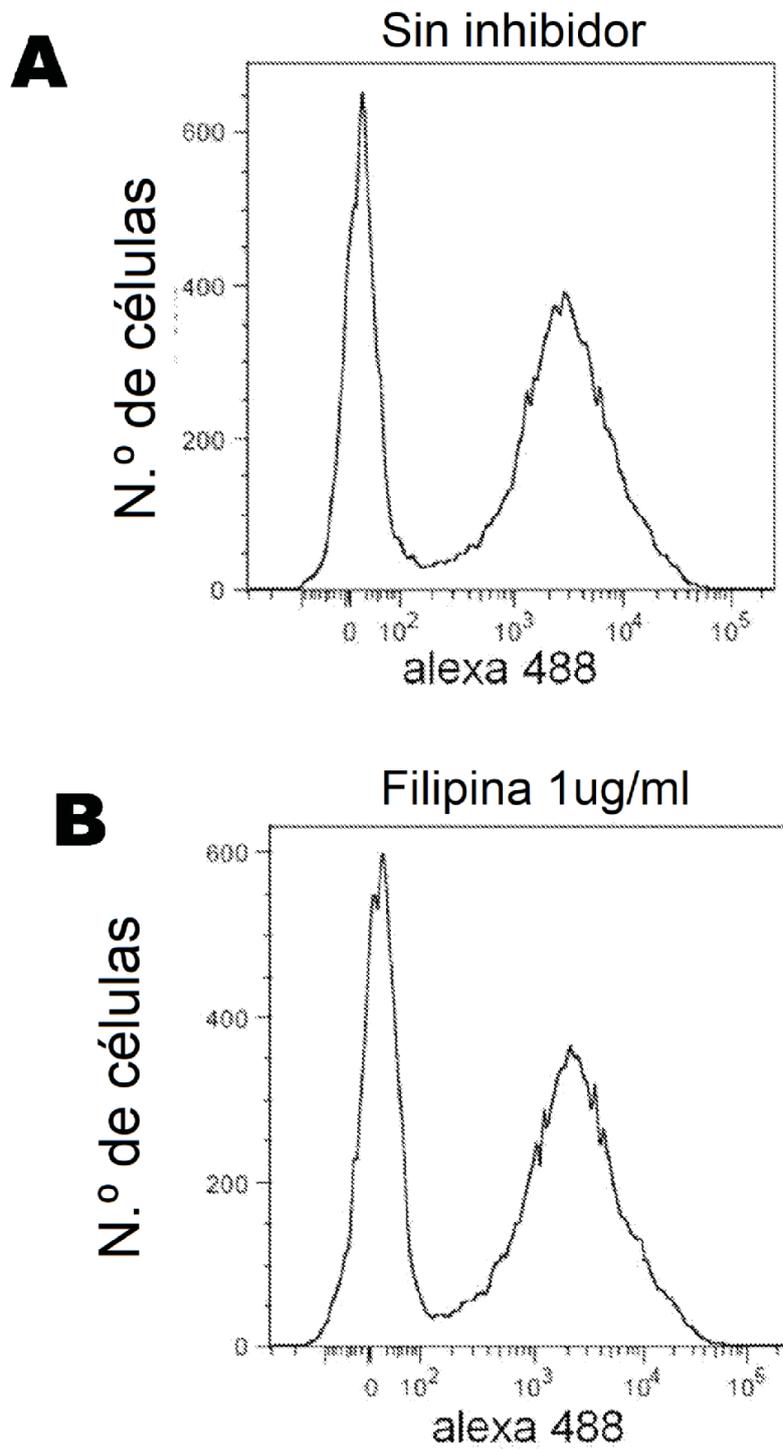
**FIG. 15**



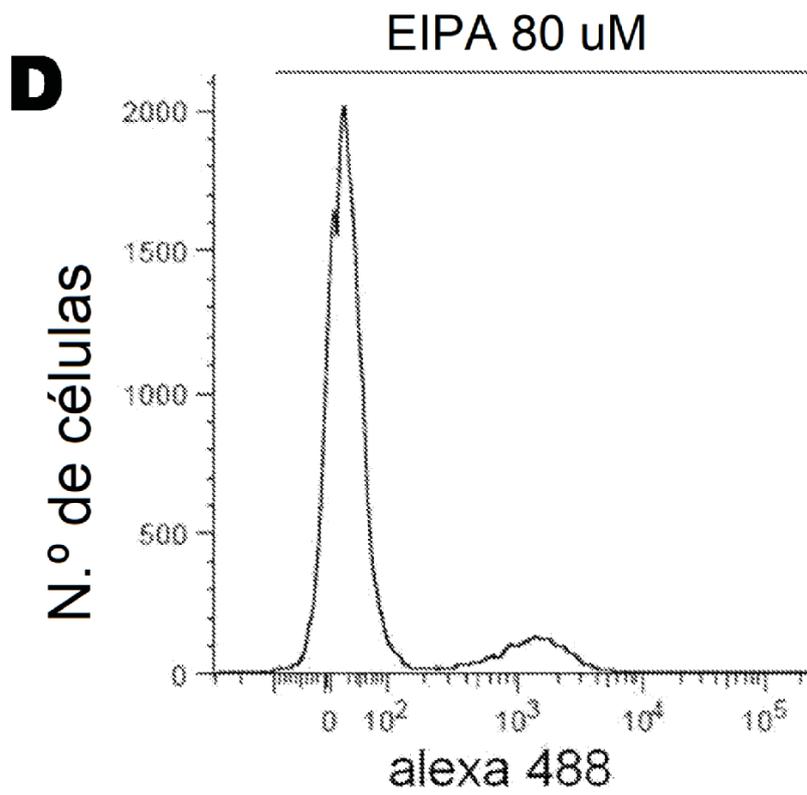
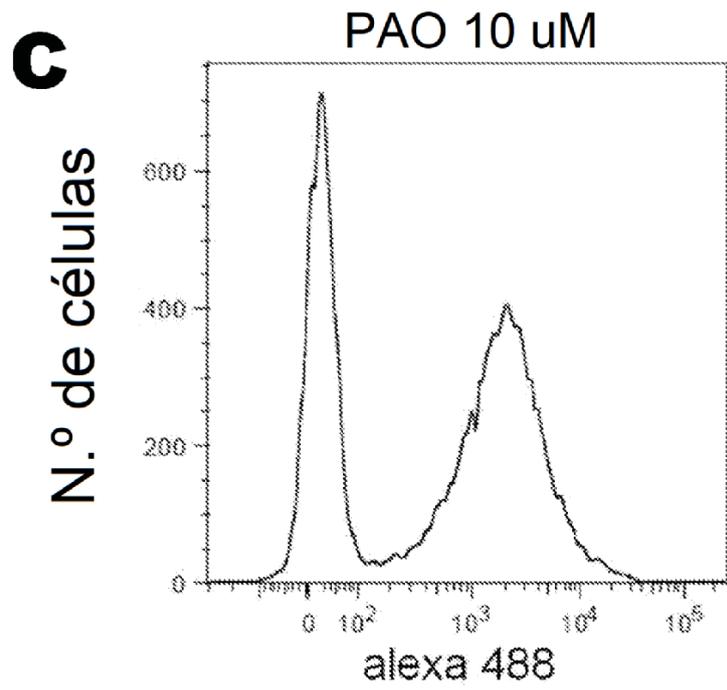
**FIG. 16**



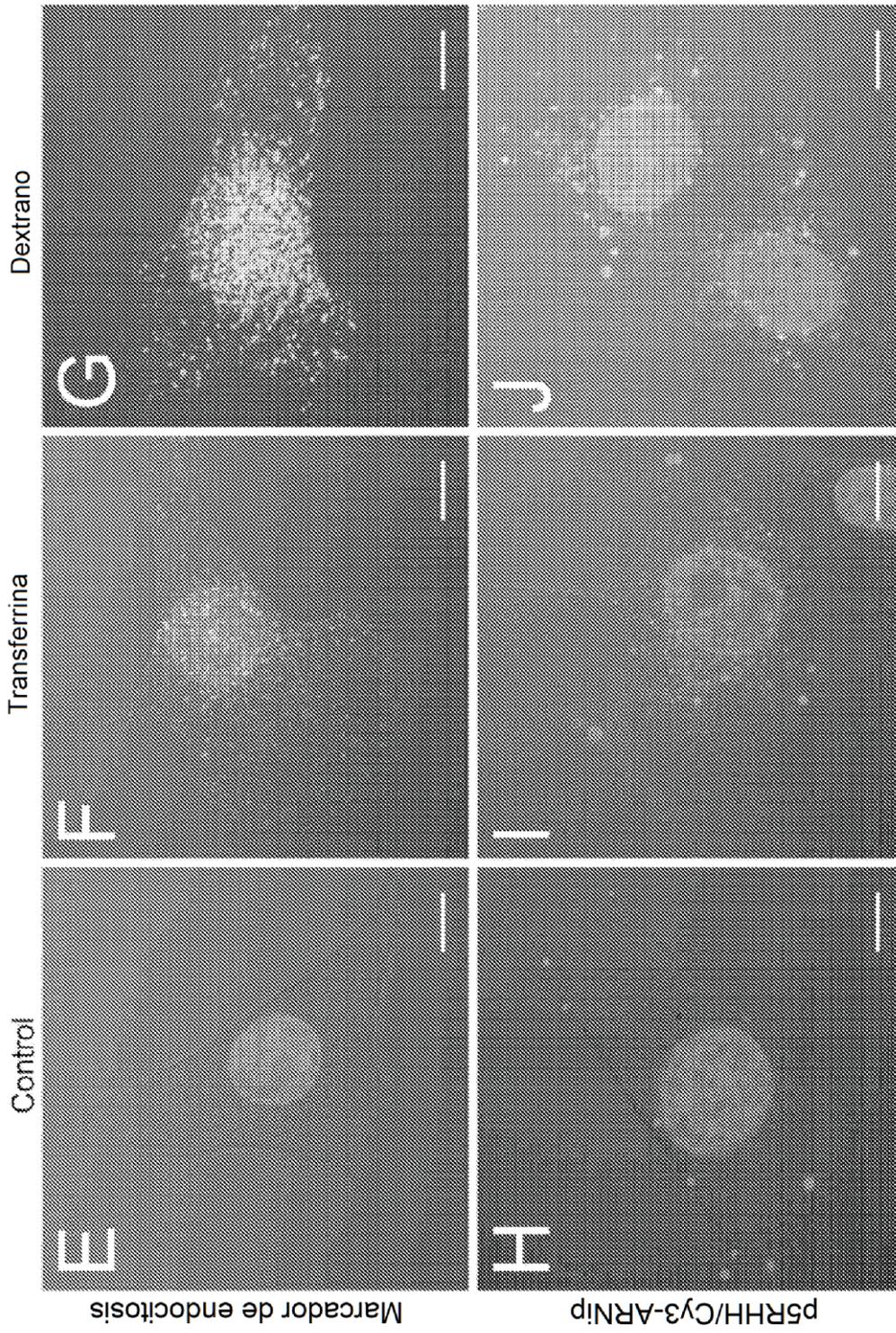
**FIG. 16C**



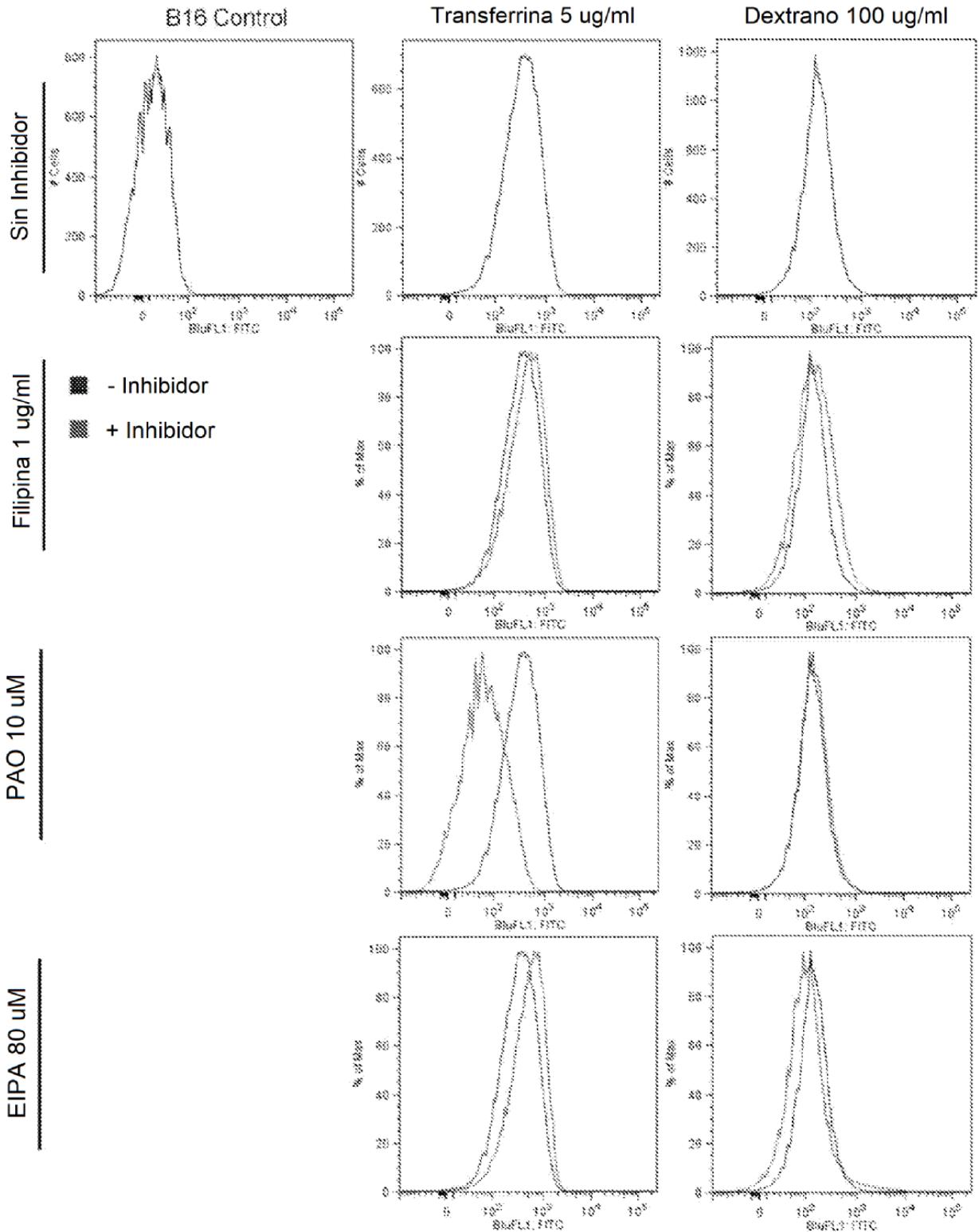
**FIG. 17**



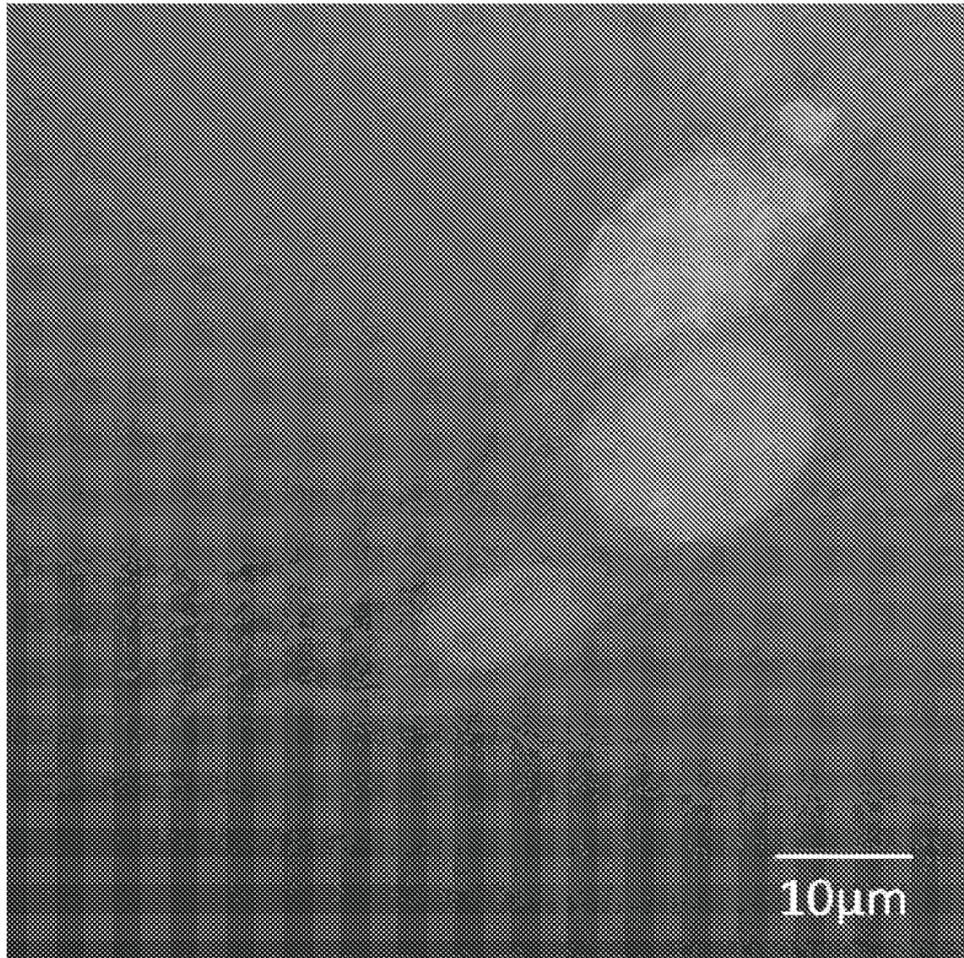
**FIG. 17**



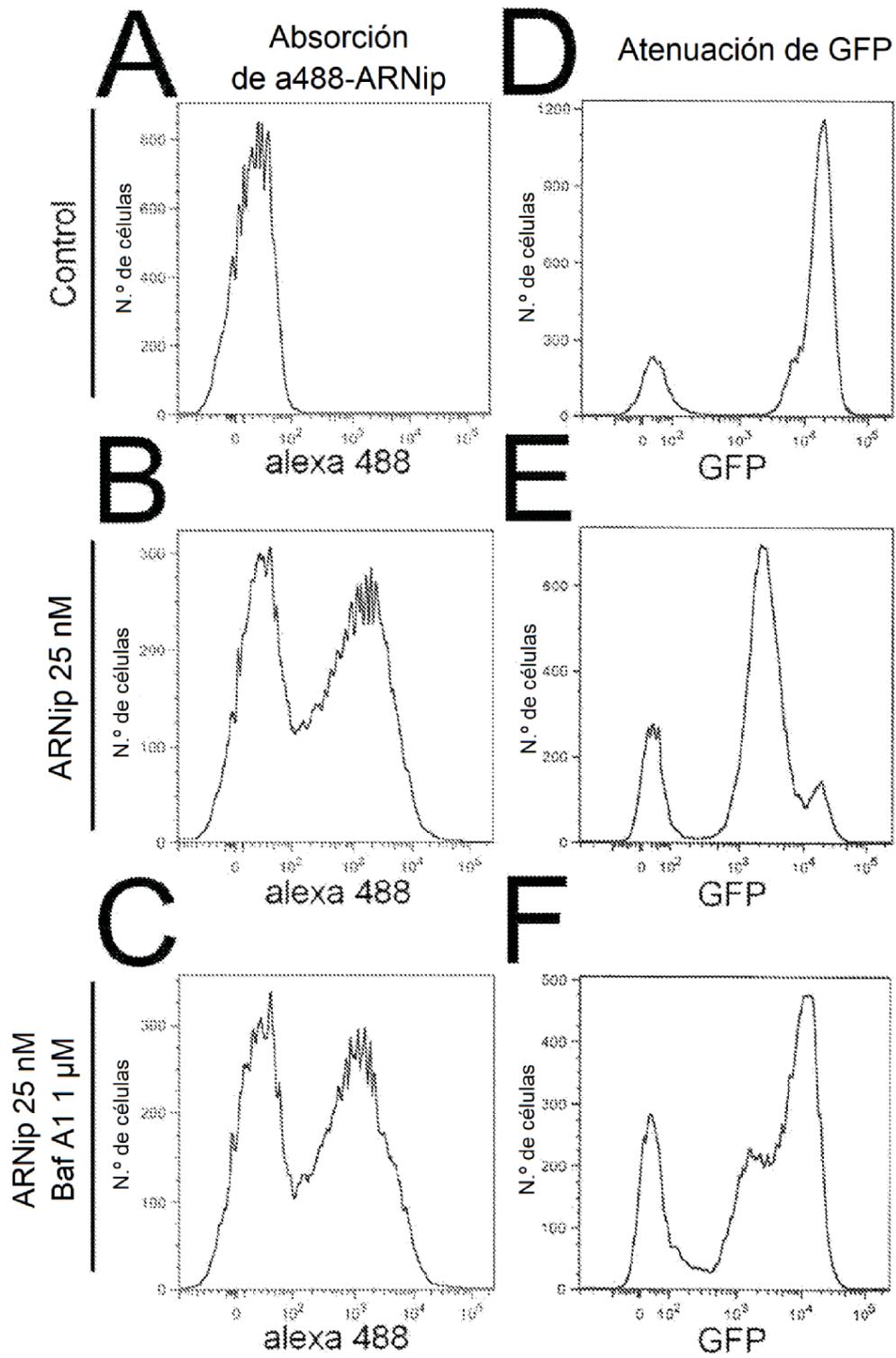
**FIG. 17**



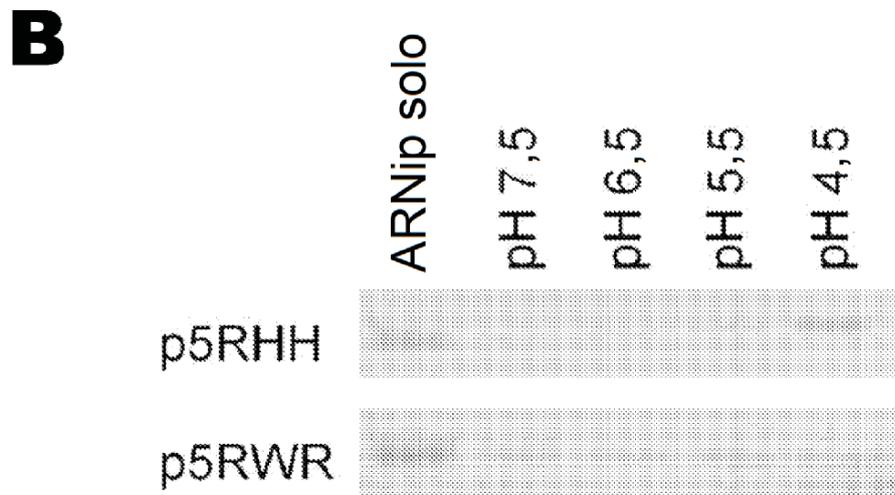
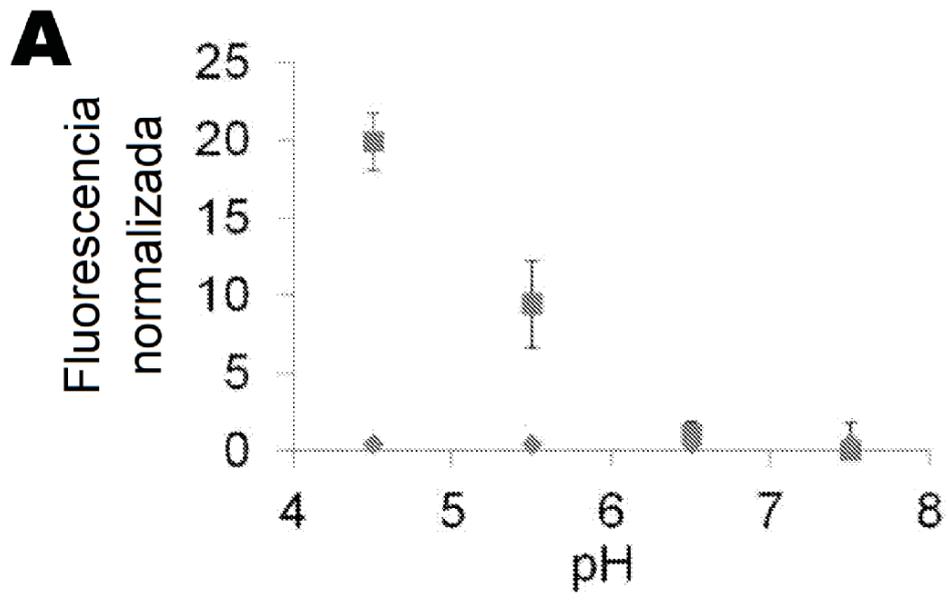
**FIG. 18**



**FIG. 19**

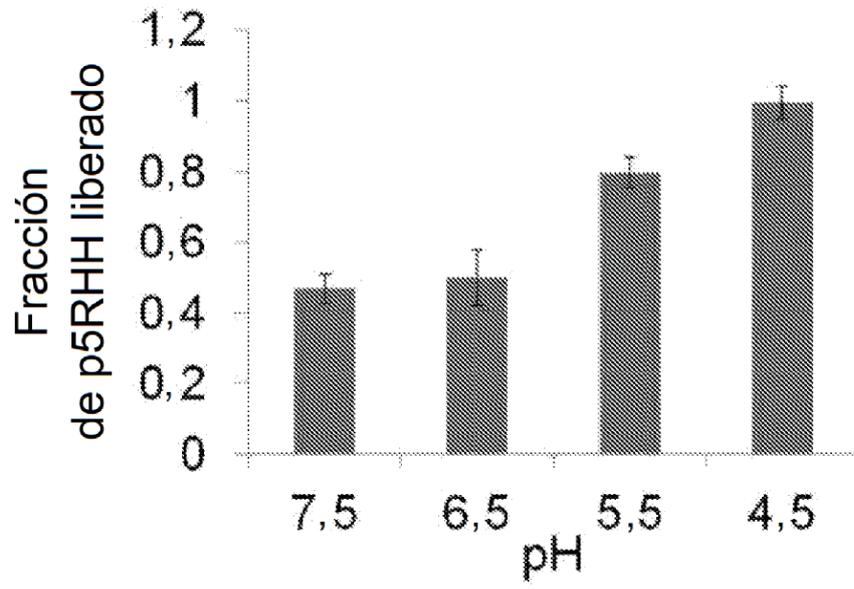


**FIG. 20**

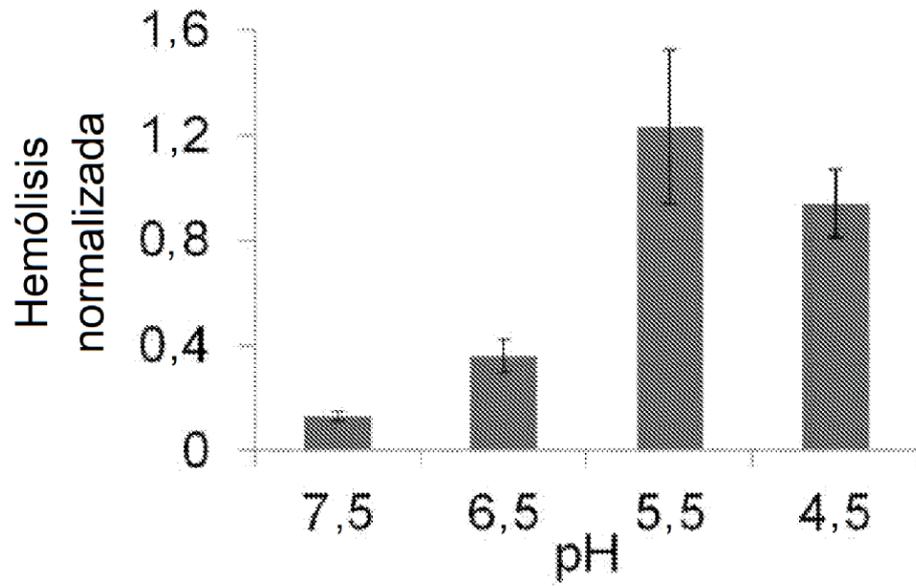


**FIG. 21**

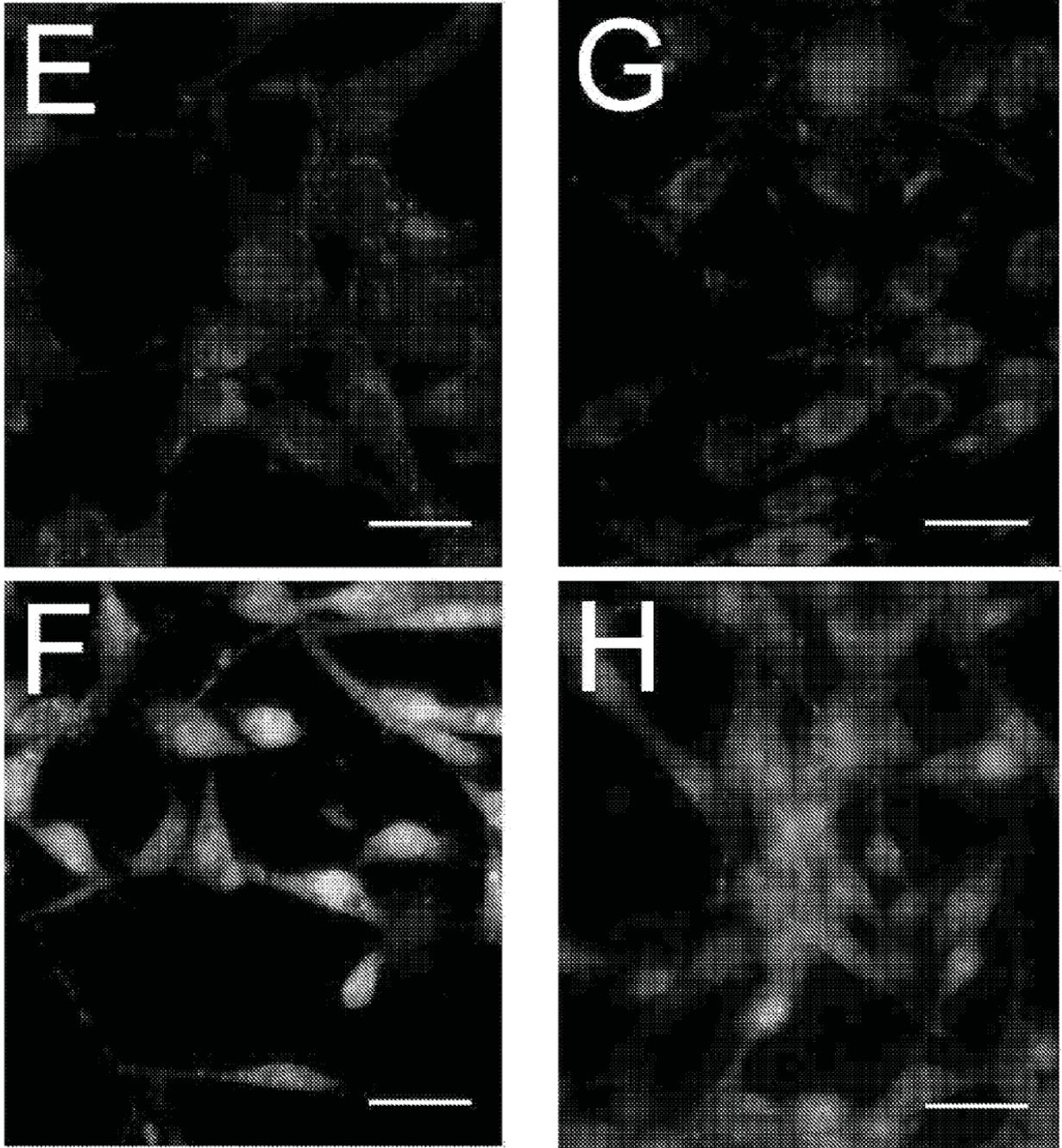
**C**



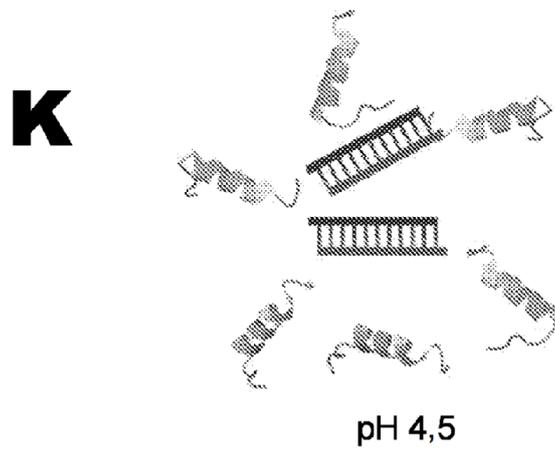
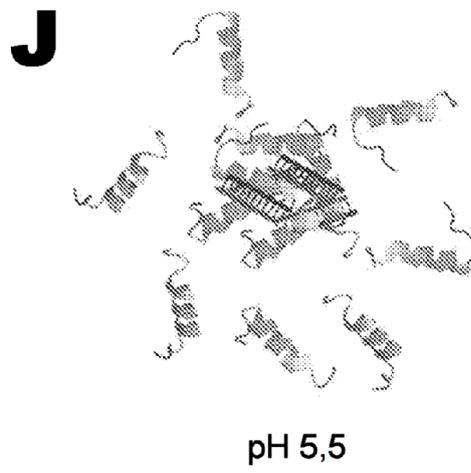
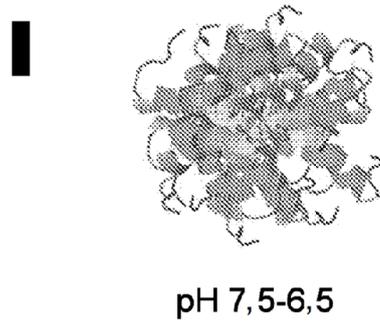
**D**



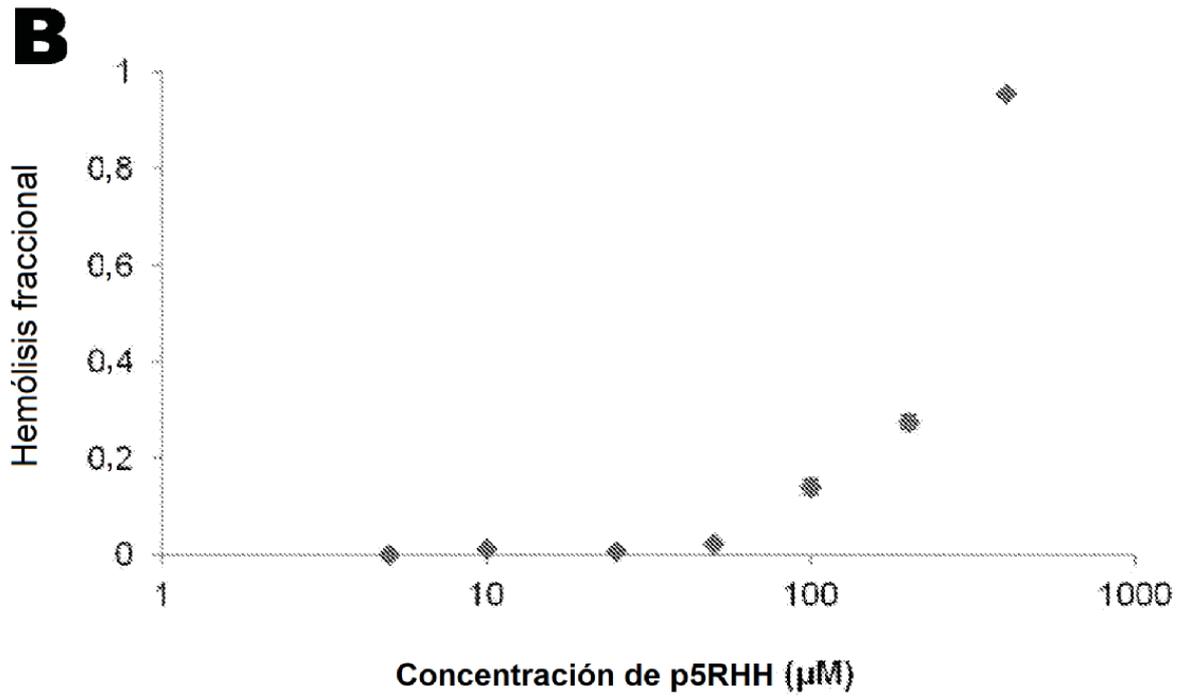
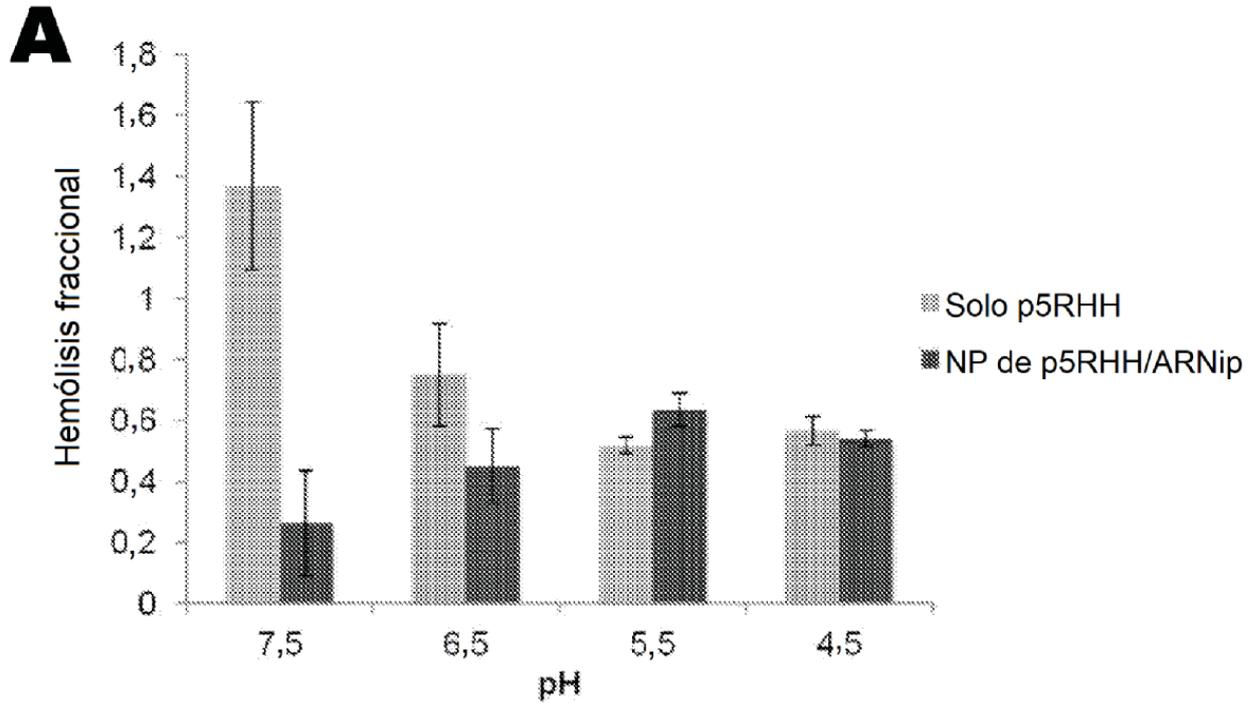
**FIG. 21**



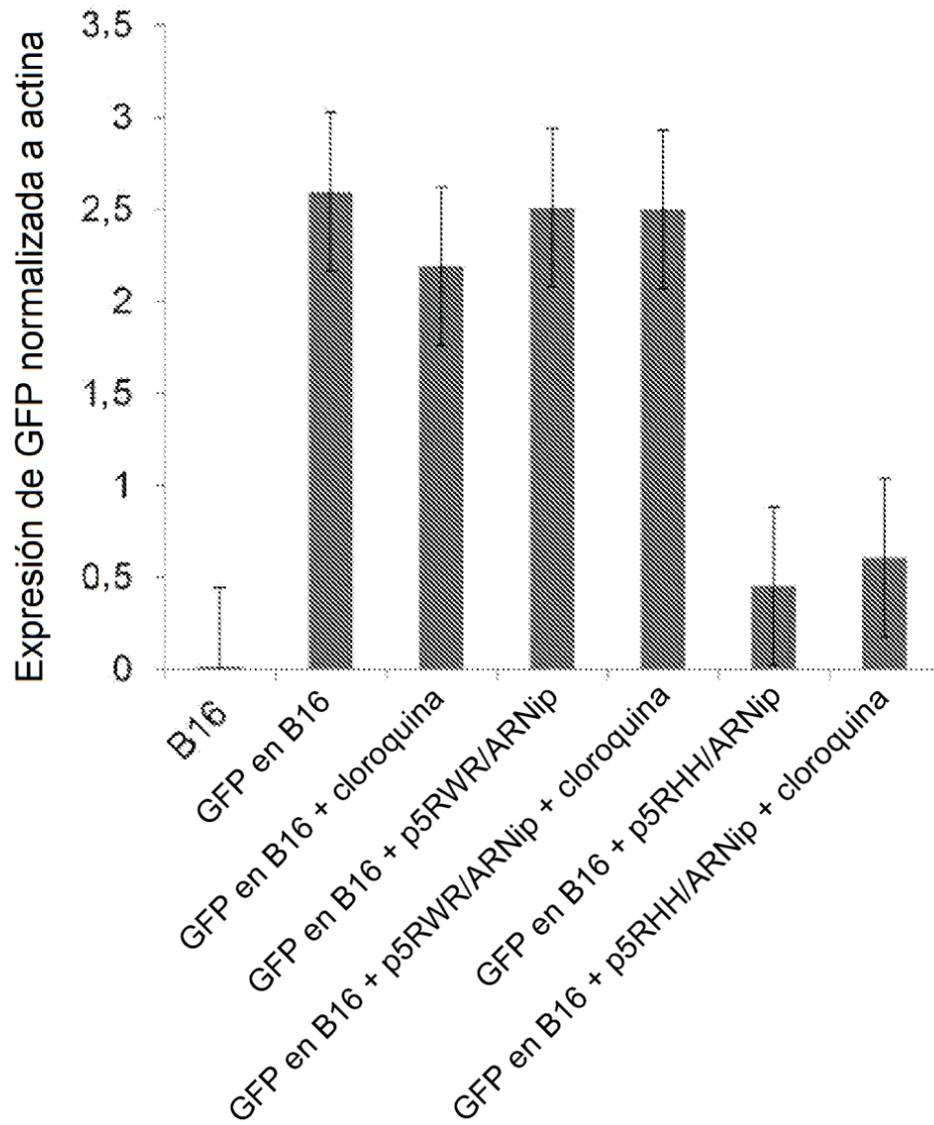
**FIG. 21**

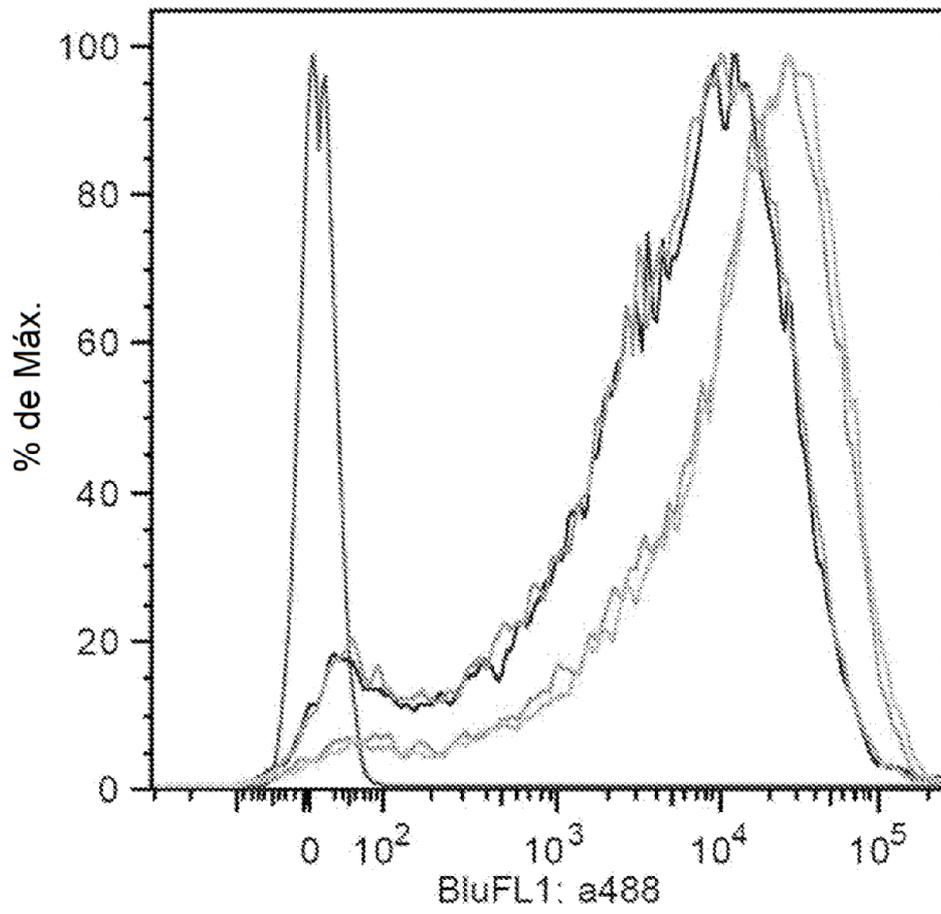


**FIG. 21**

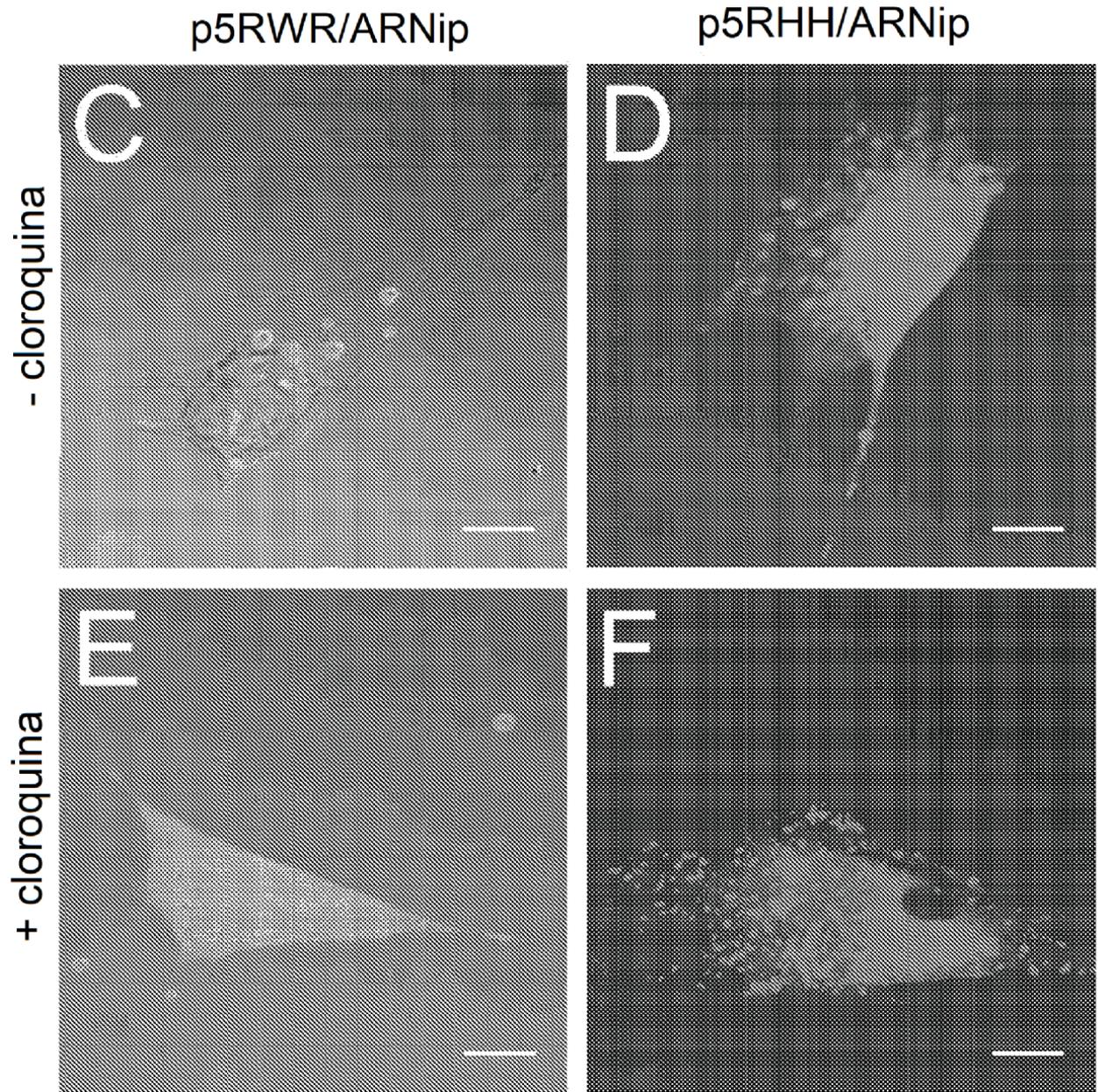


**FIG. 22**

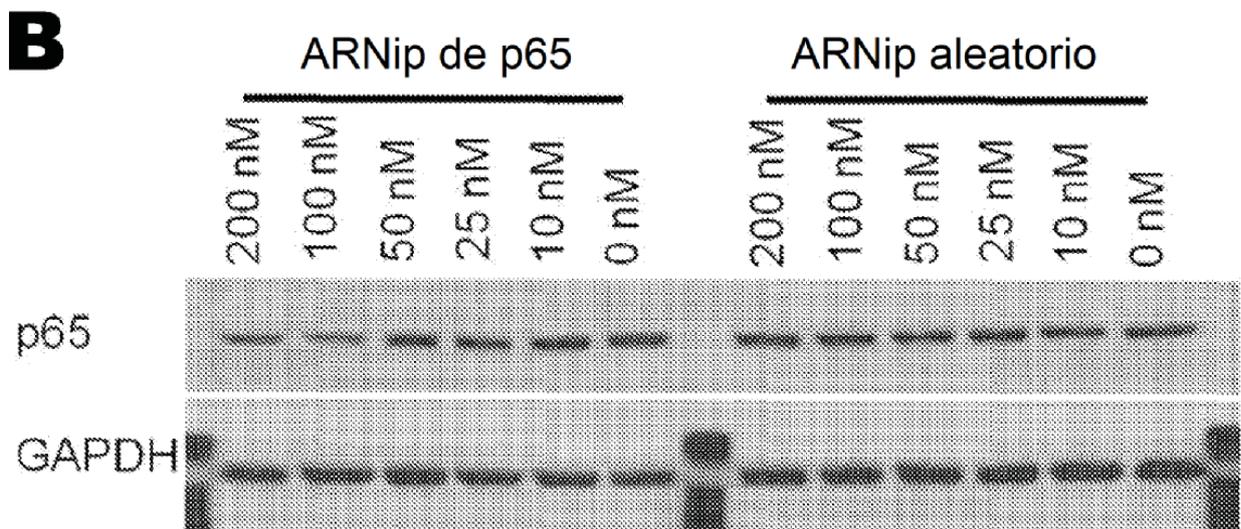
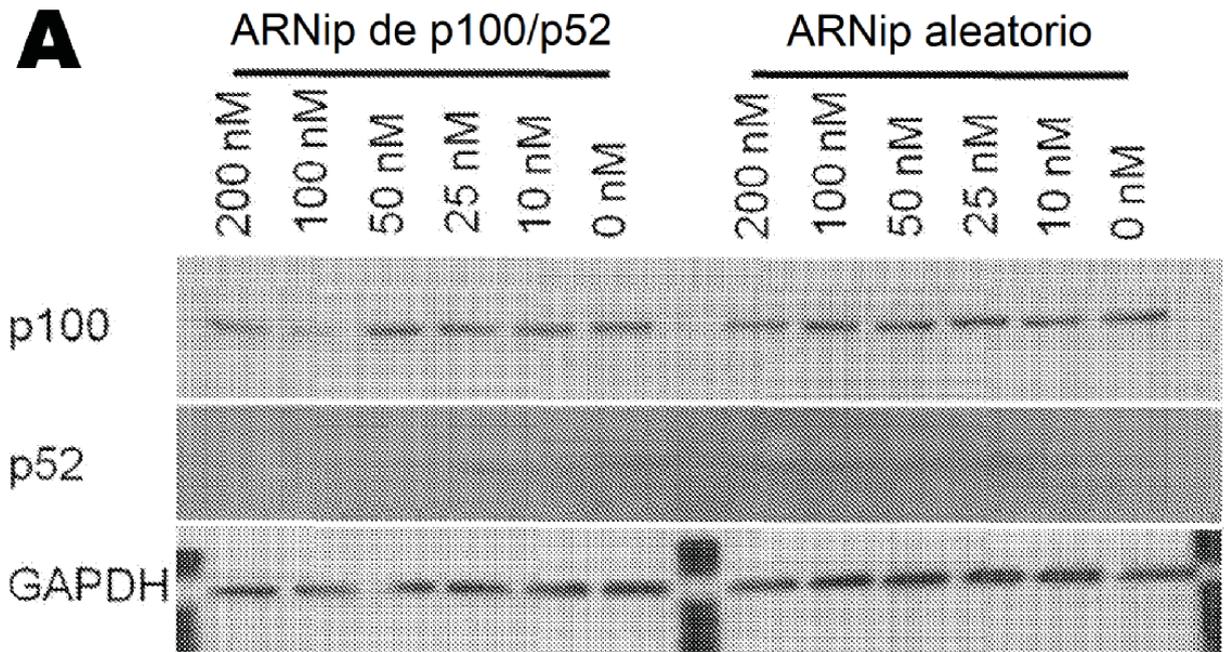
**FIG. 23A**



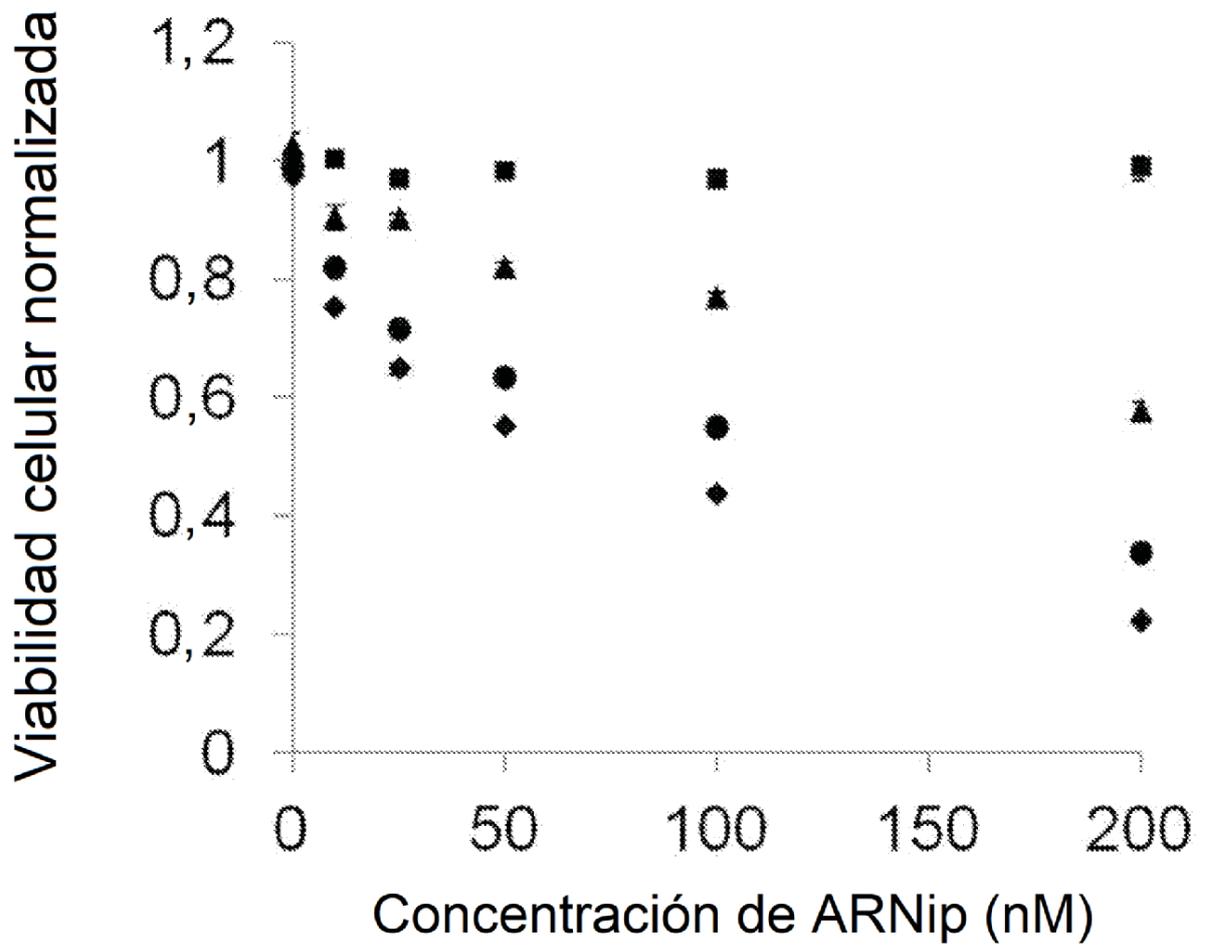
**FIG. 23B**



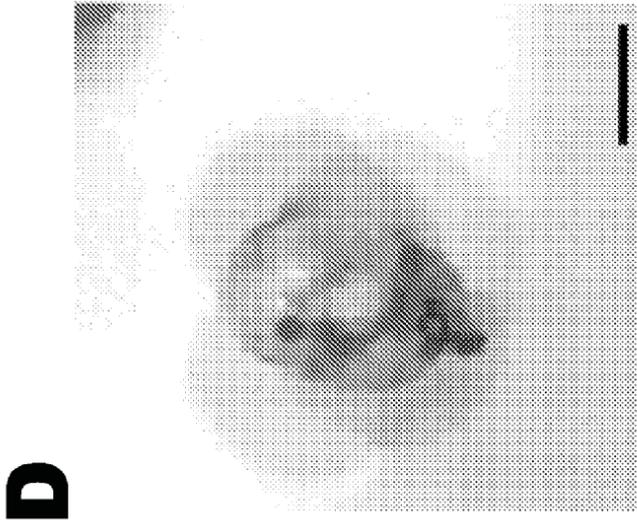
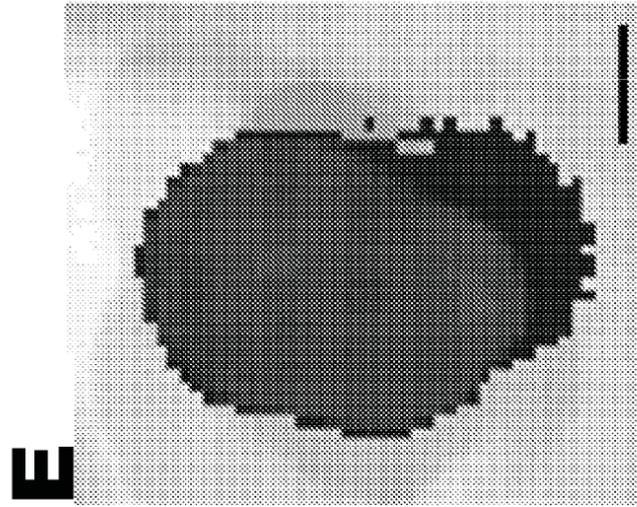
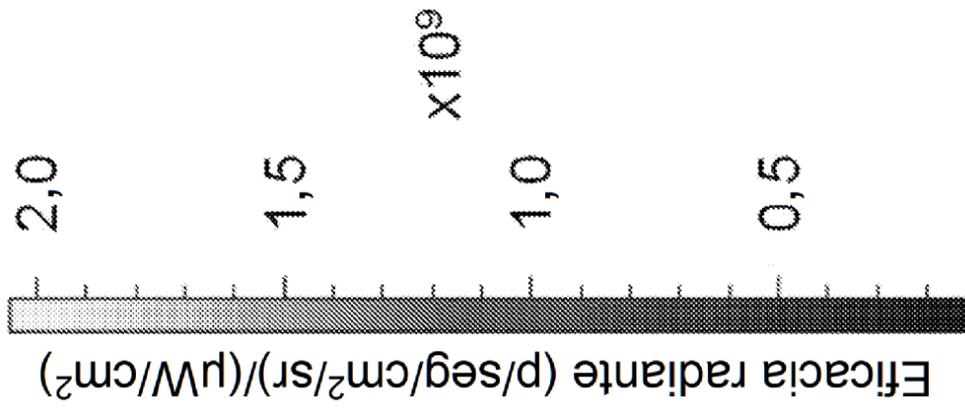
**FIG. 23**



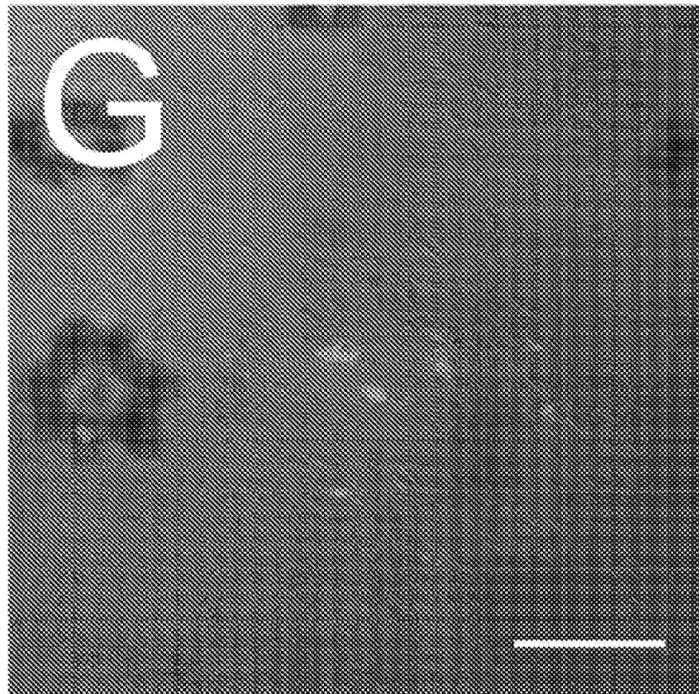
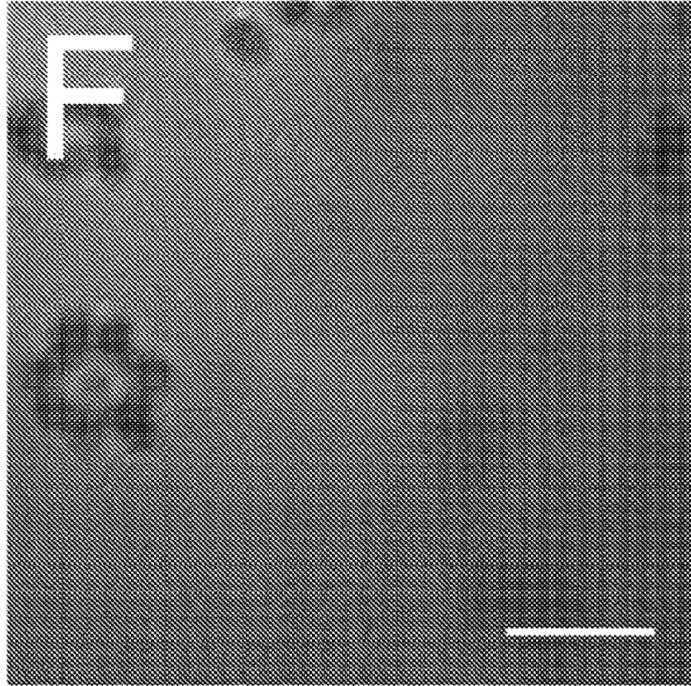
**FIG. 24**



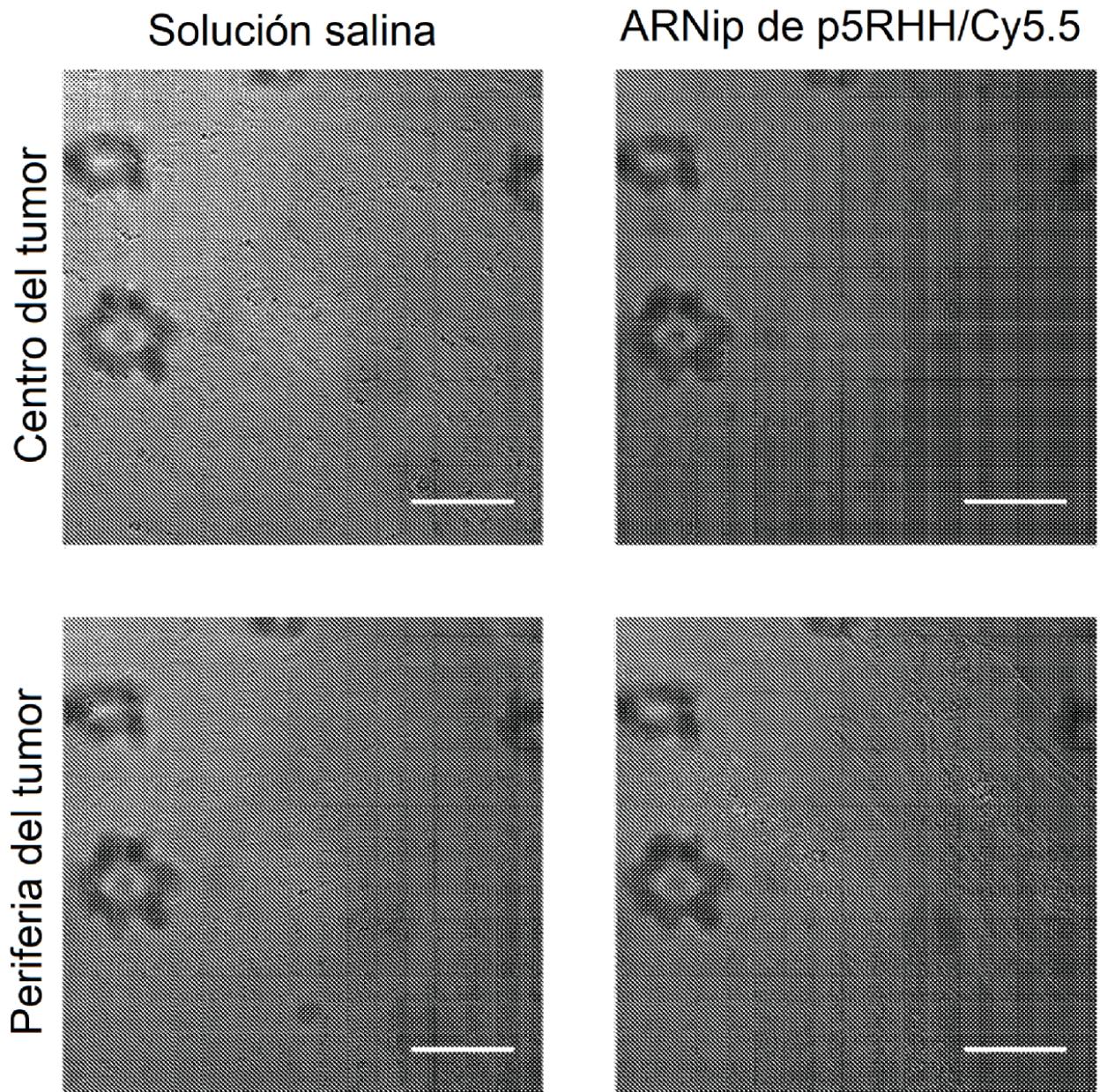
**FIG. 24C**



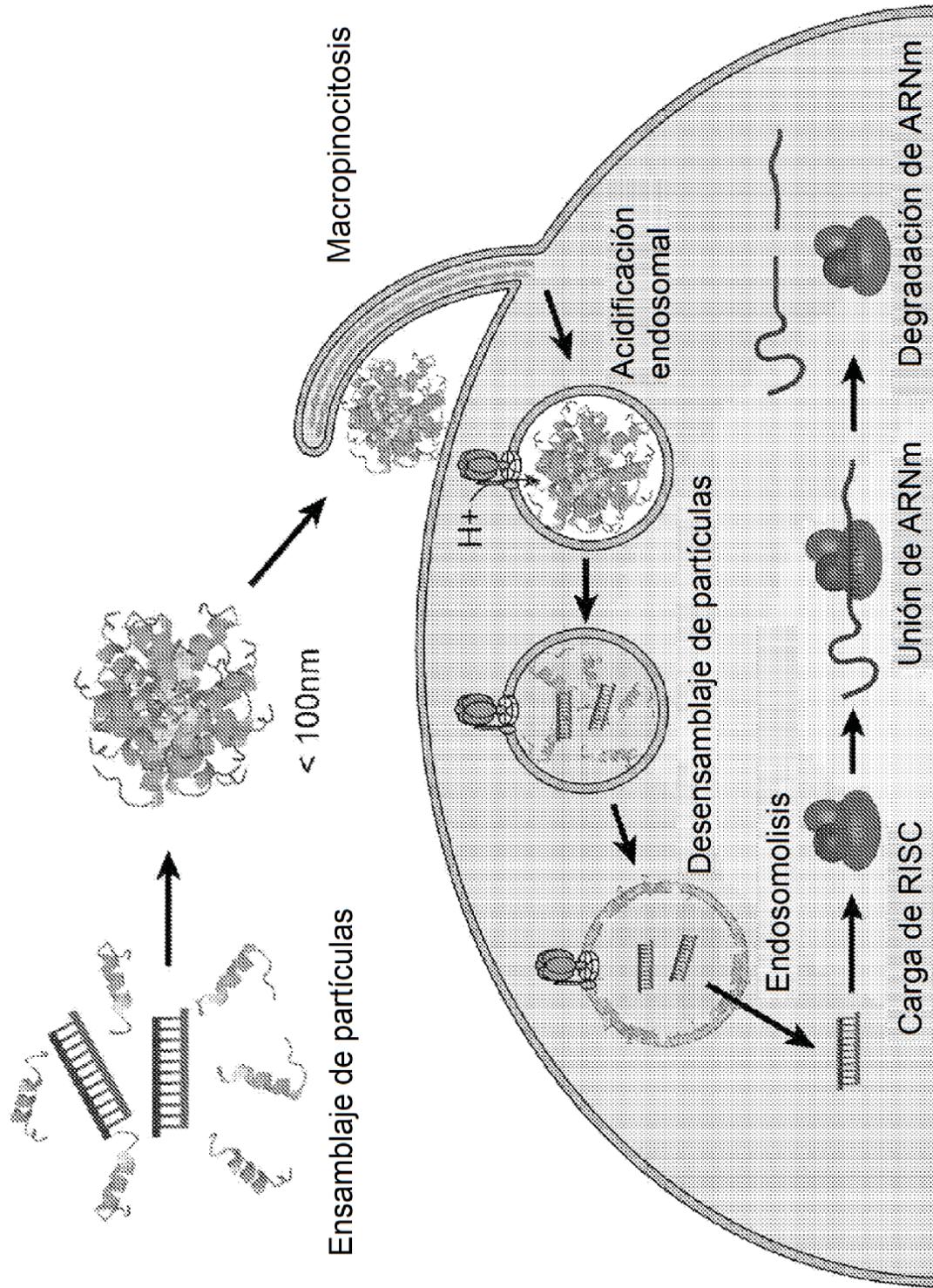
**FIG. 24**



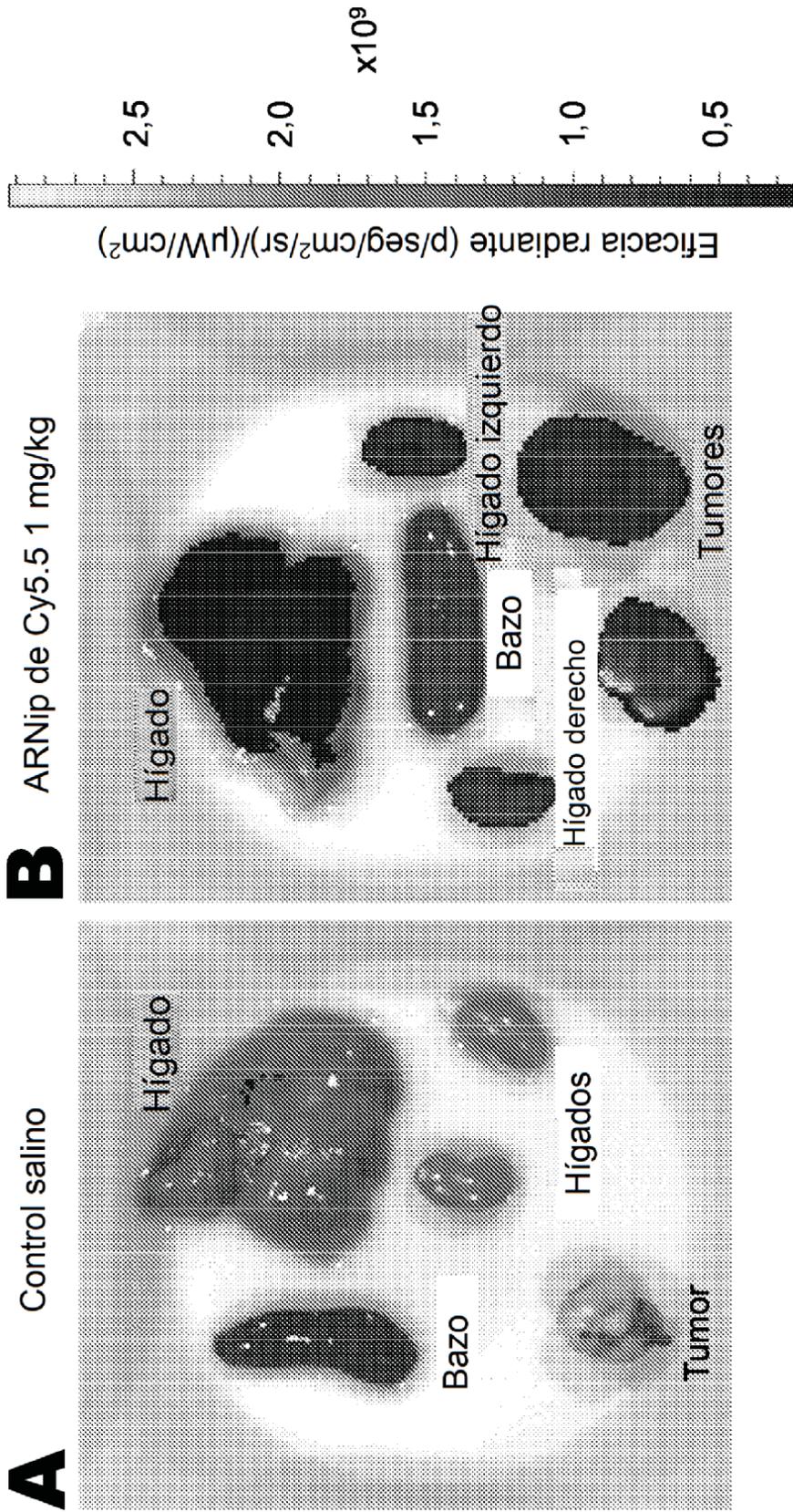
**FIG. 24**



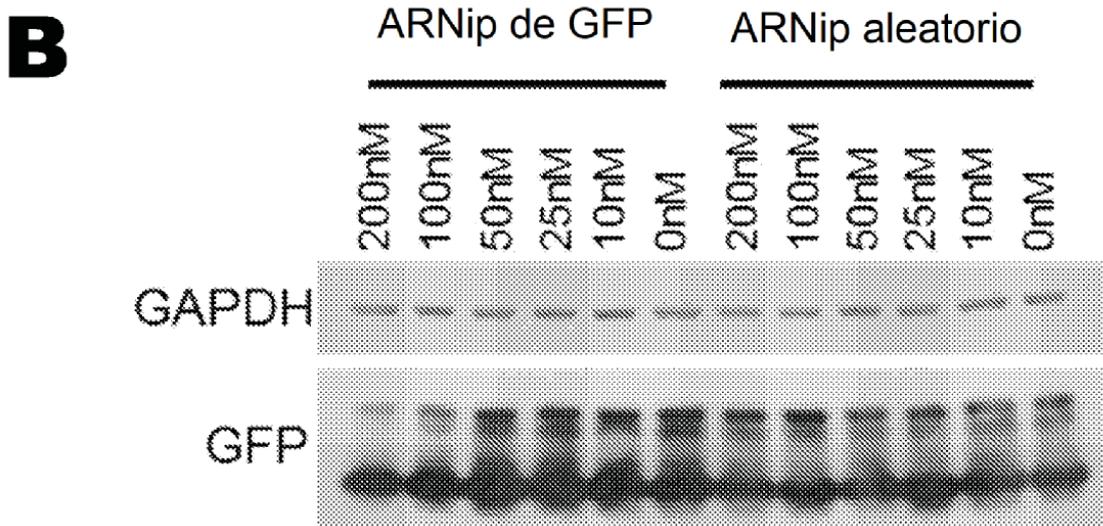
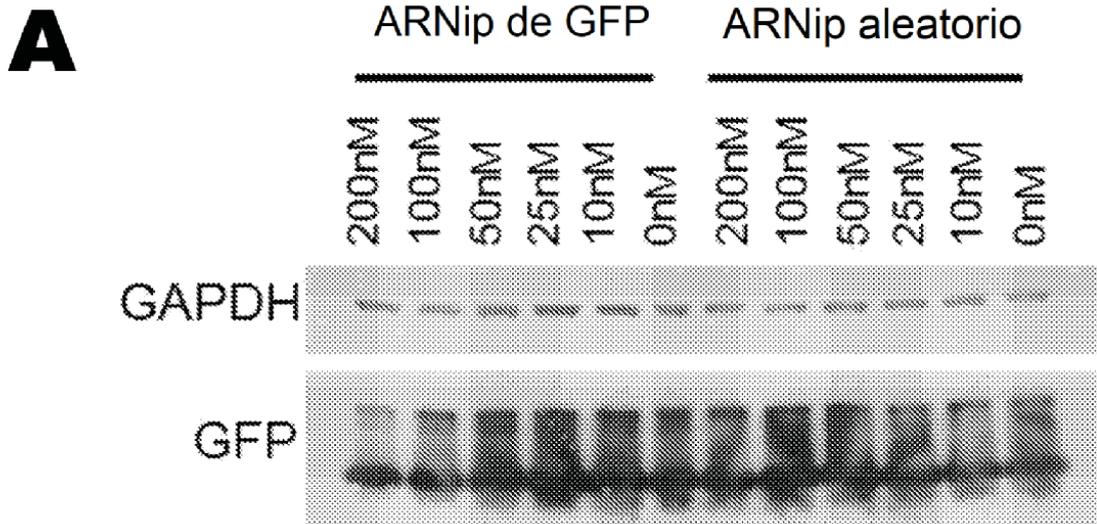
**FIG. 25**



**FIG. 26**

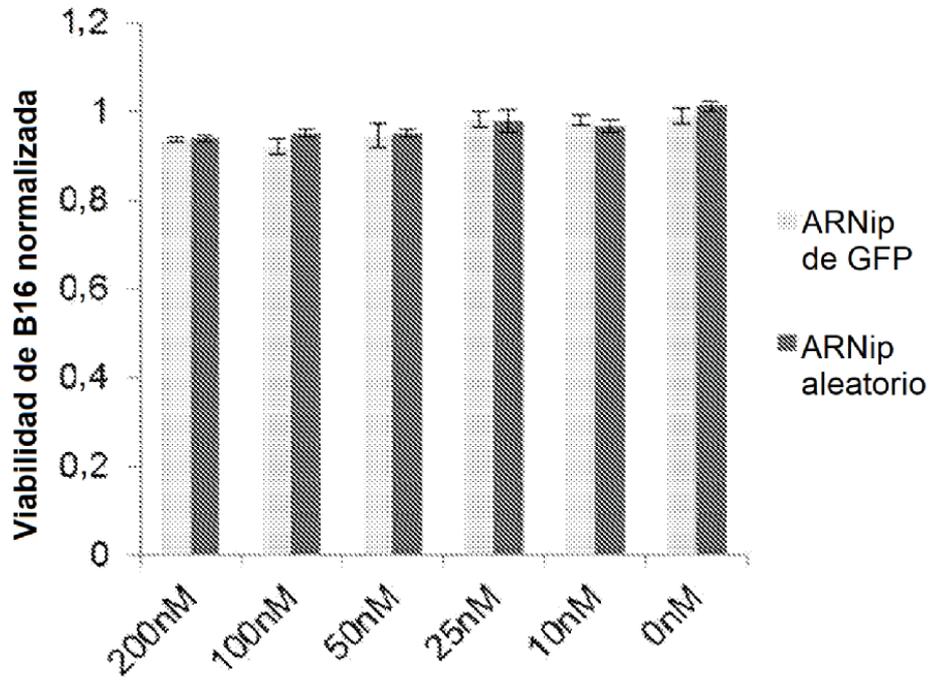


**FIG. 27**

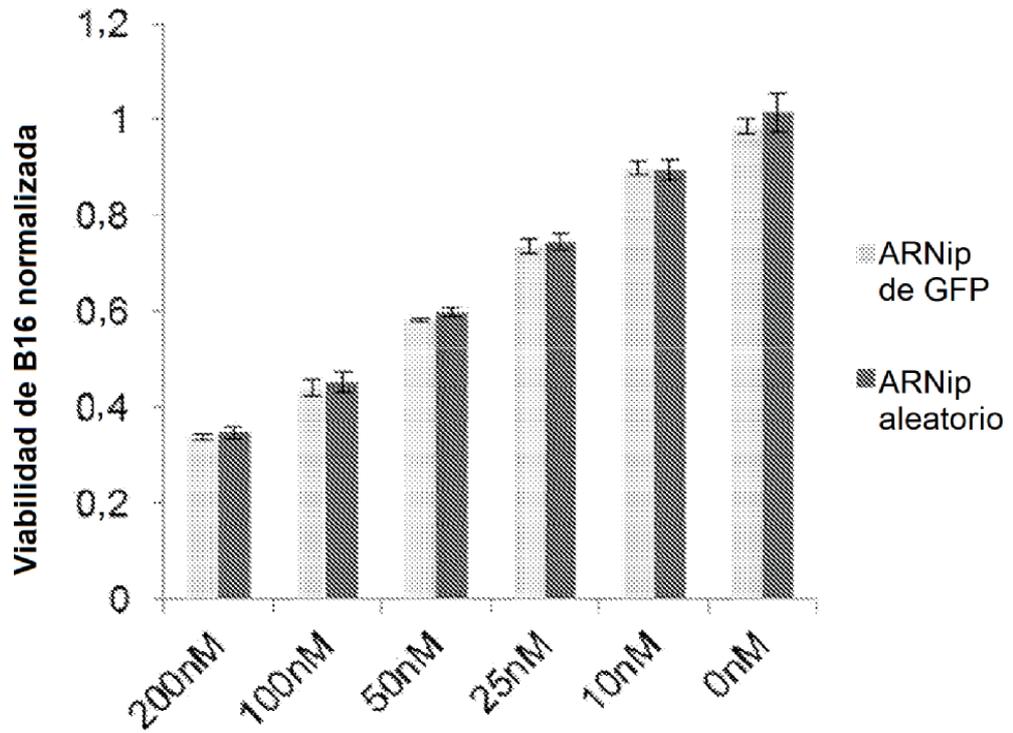


**FIG. 28**

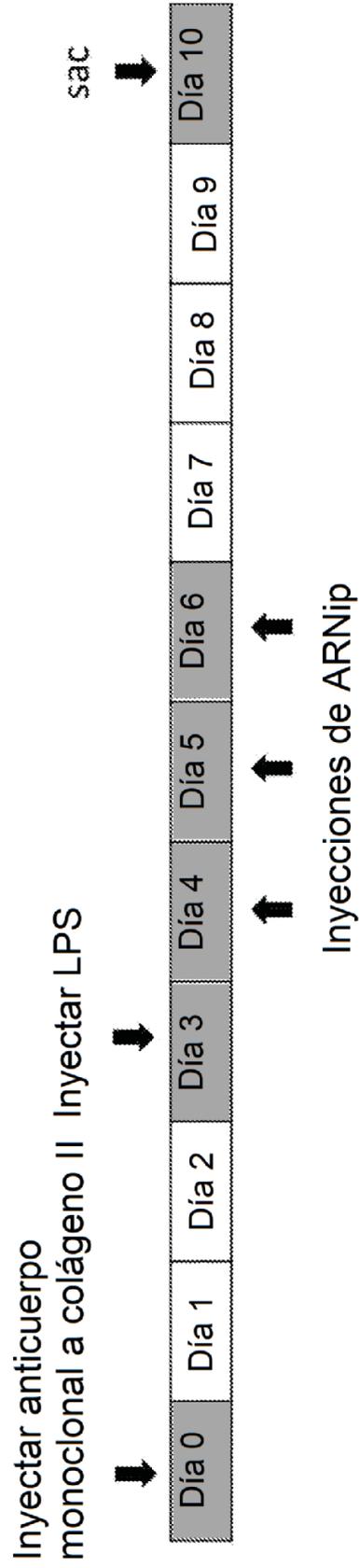
**C**



**D**

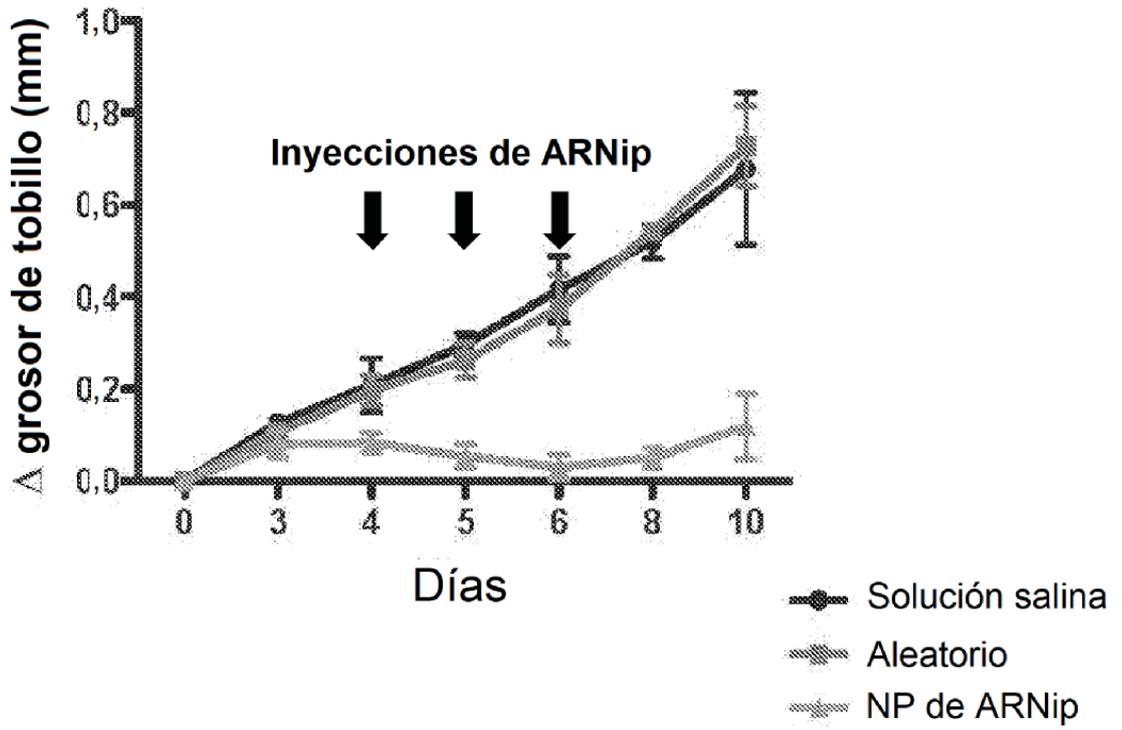


**FIG. 28**

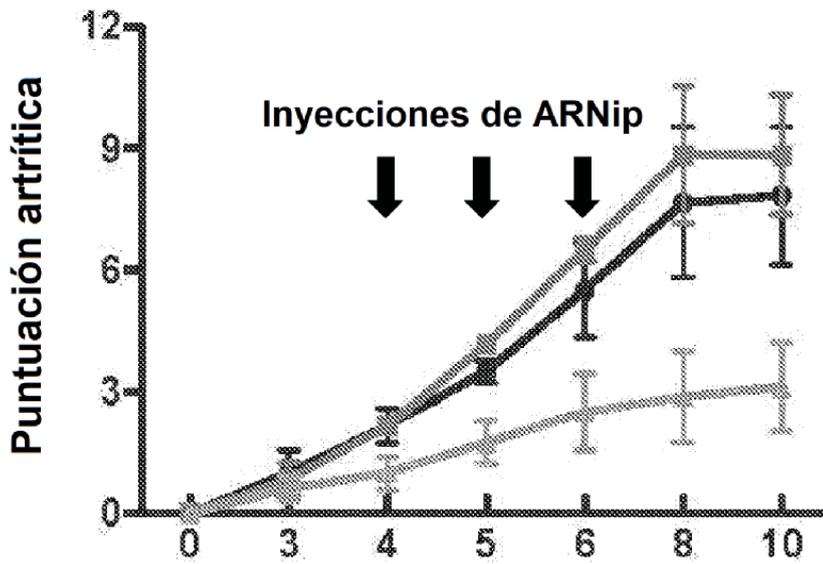


**FIG. 29**

**A**



**B**

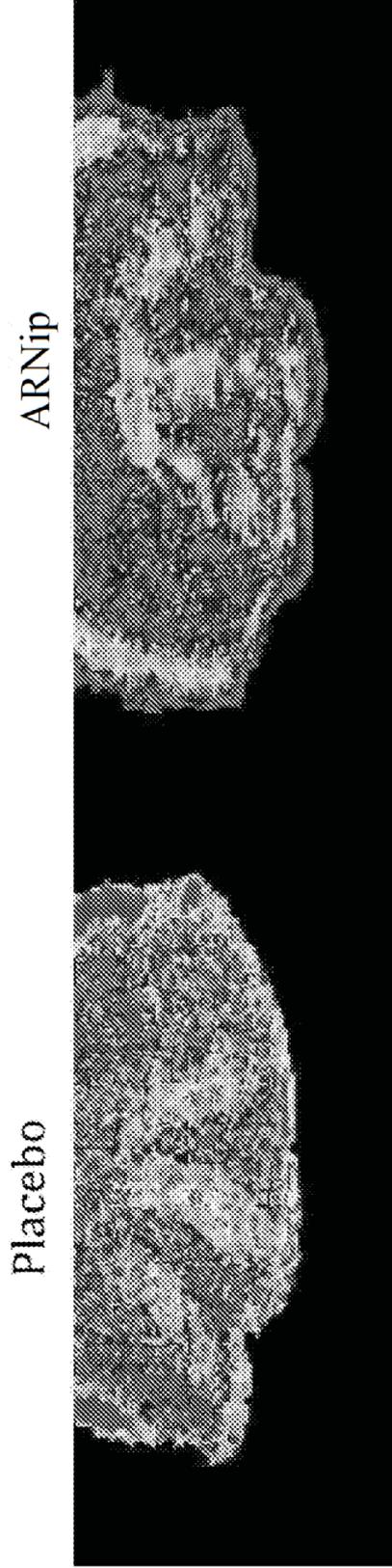


**FIG. 30**

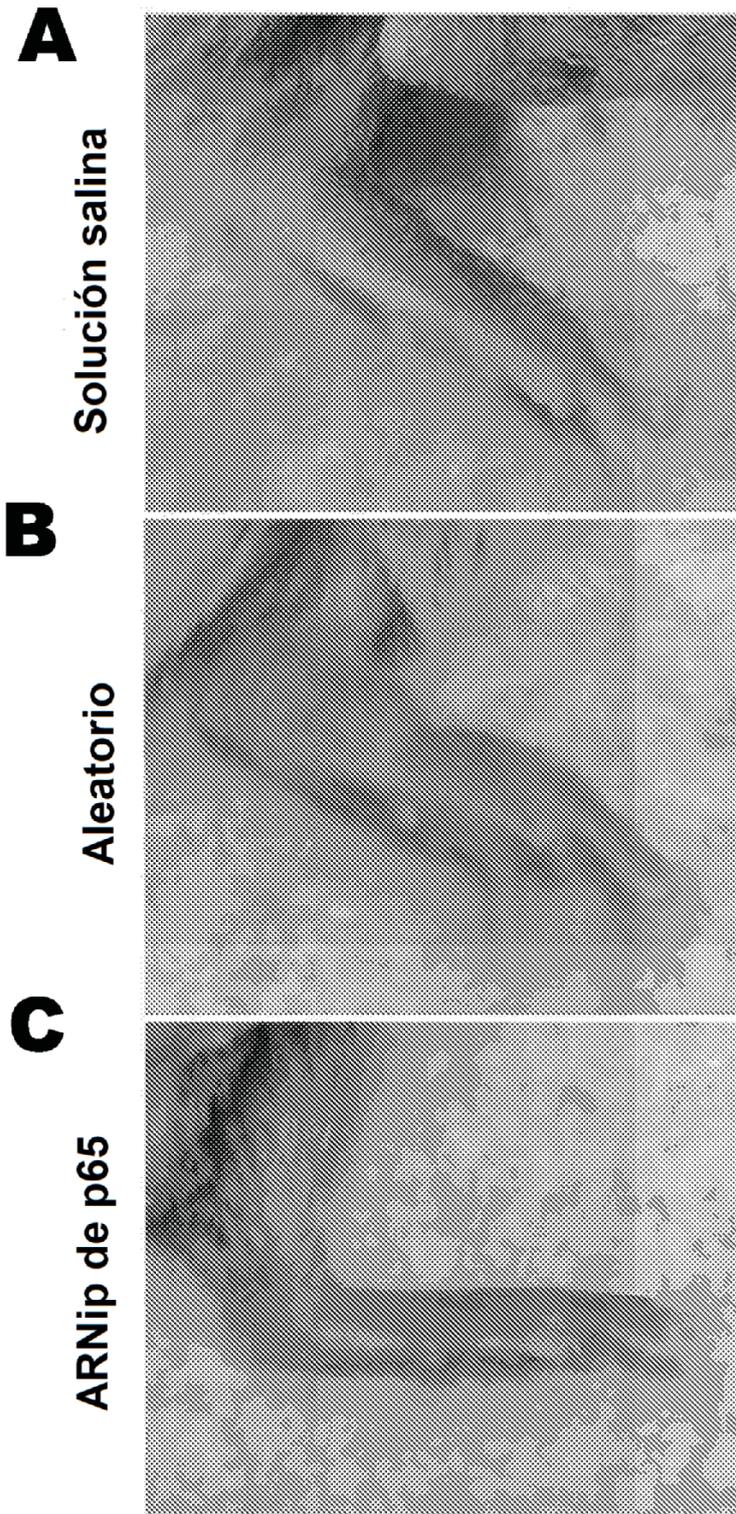


Inyectado con solución salina    Inyectado con p5RHH/ARNip Cy5.5

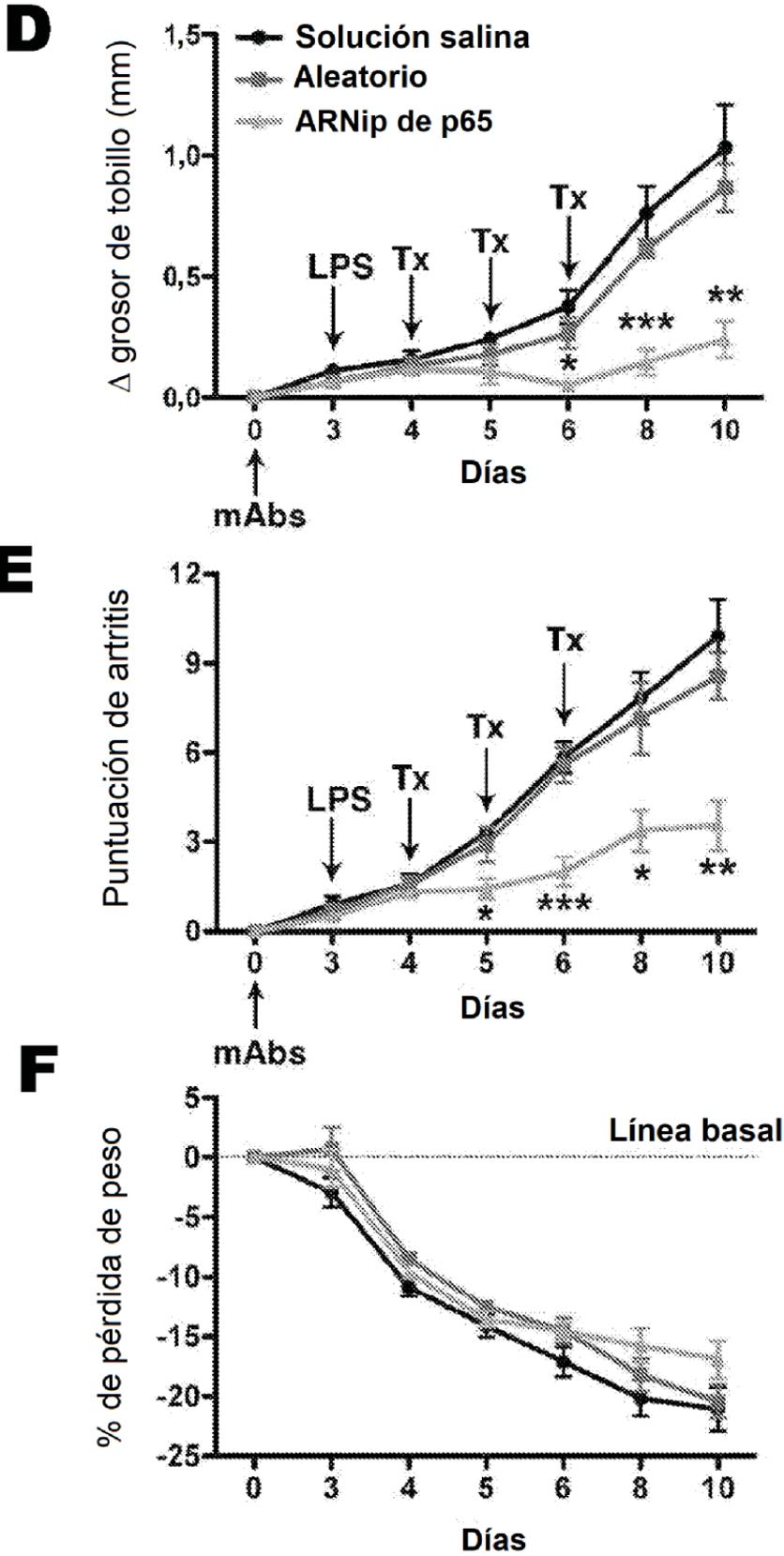
# FIG. 30C



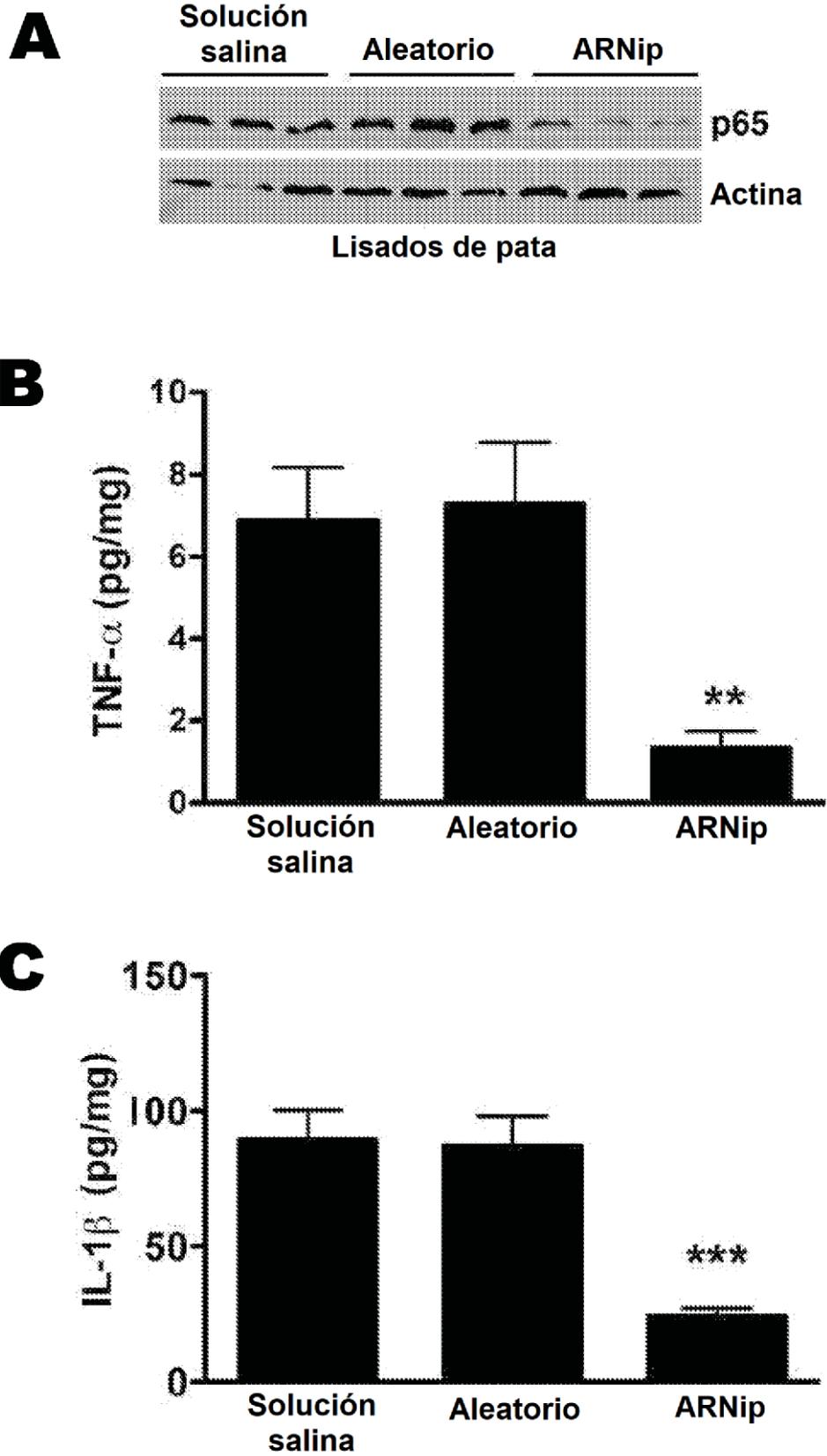
**FIG. 31**



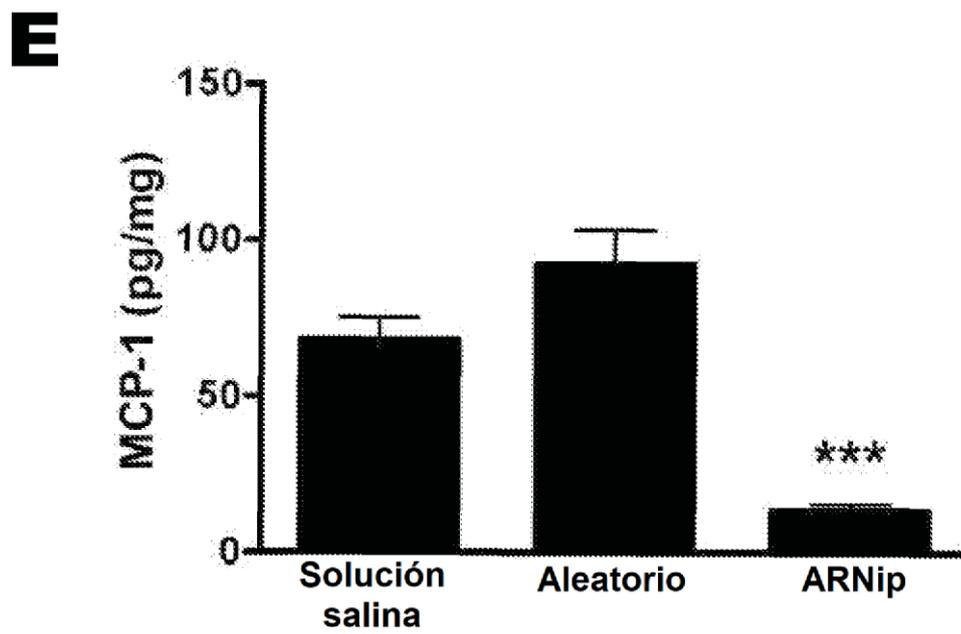
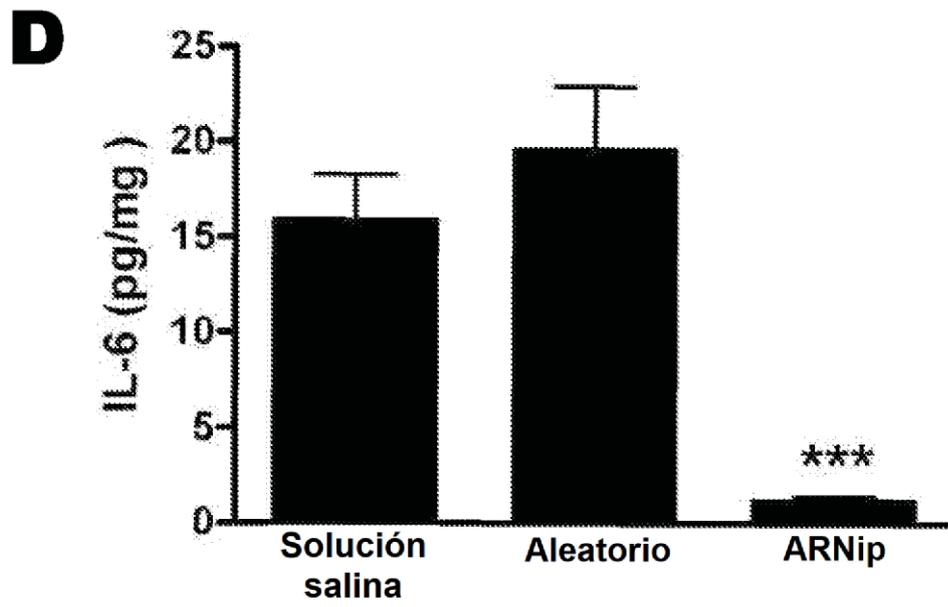
**FIG. 32**



**FIG. 32**

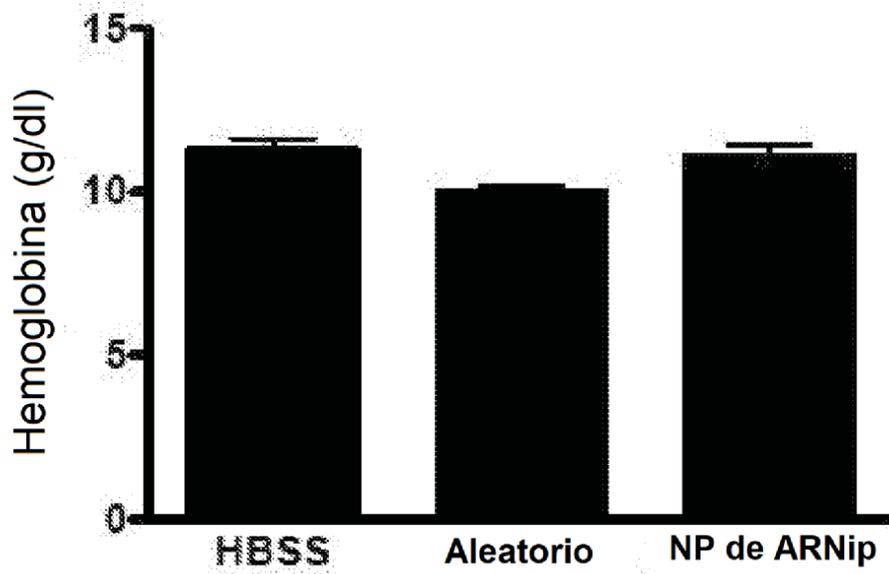


**FIG. 33**

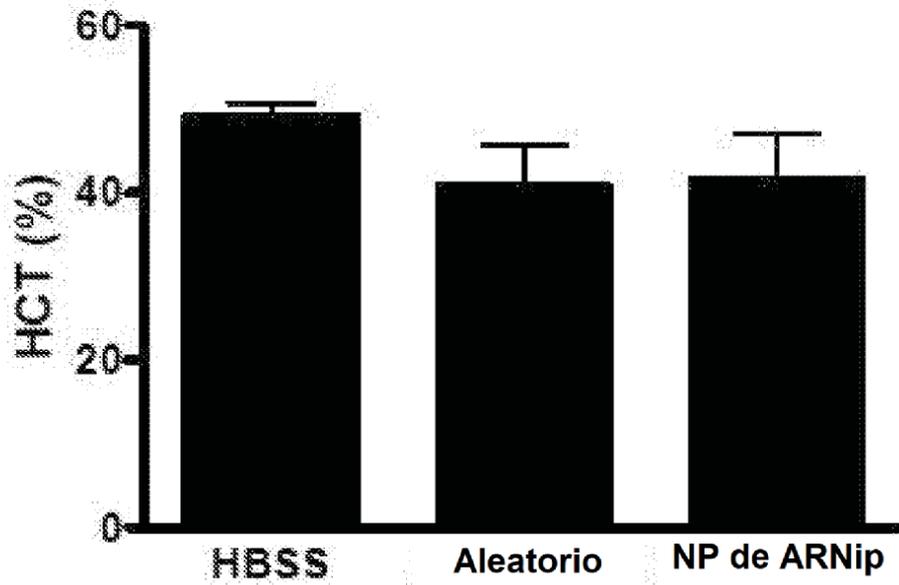


**FIG. 33**

**A**

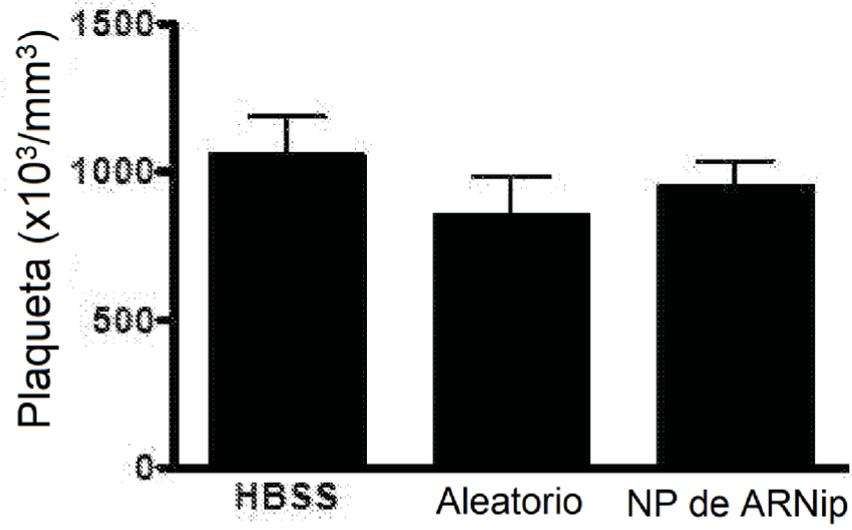


**B**

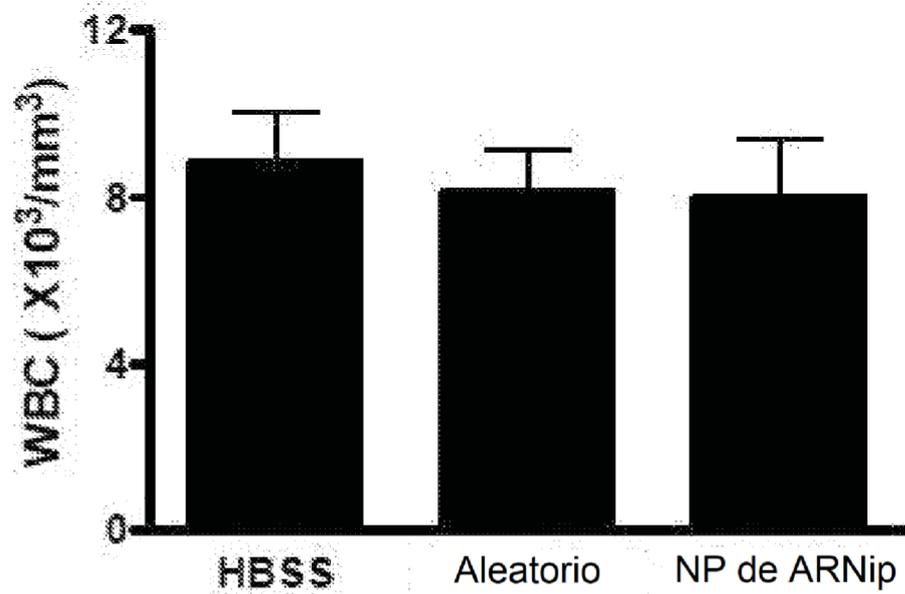


**FIG. 34**

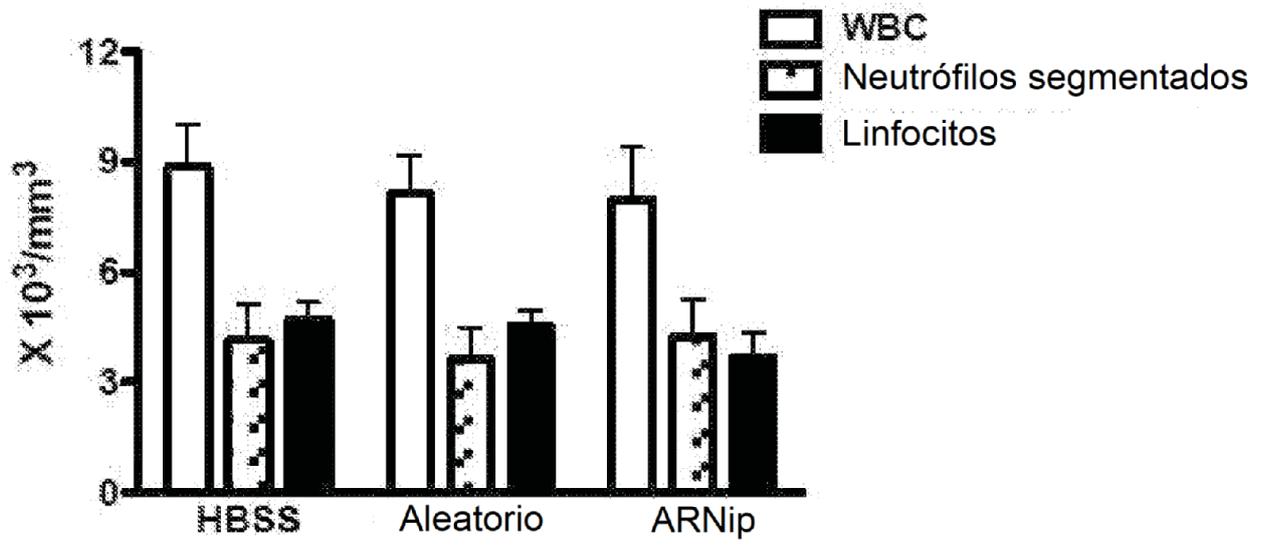
**C**



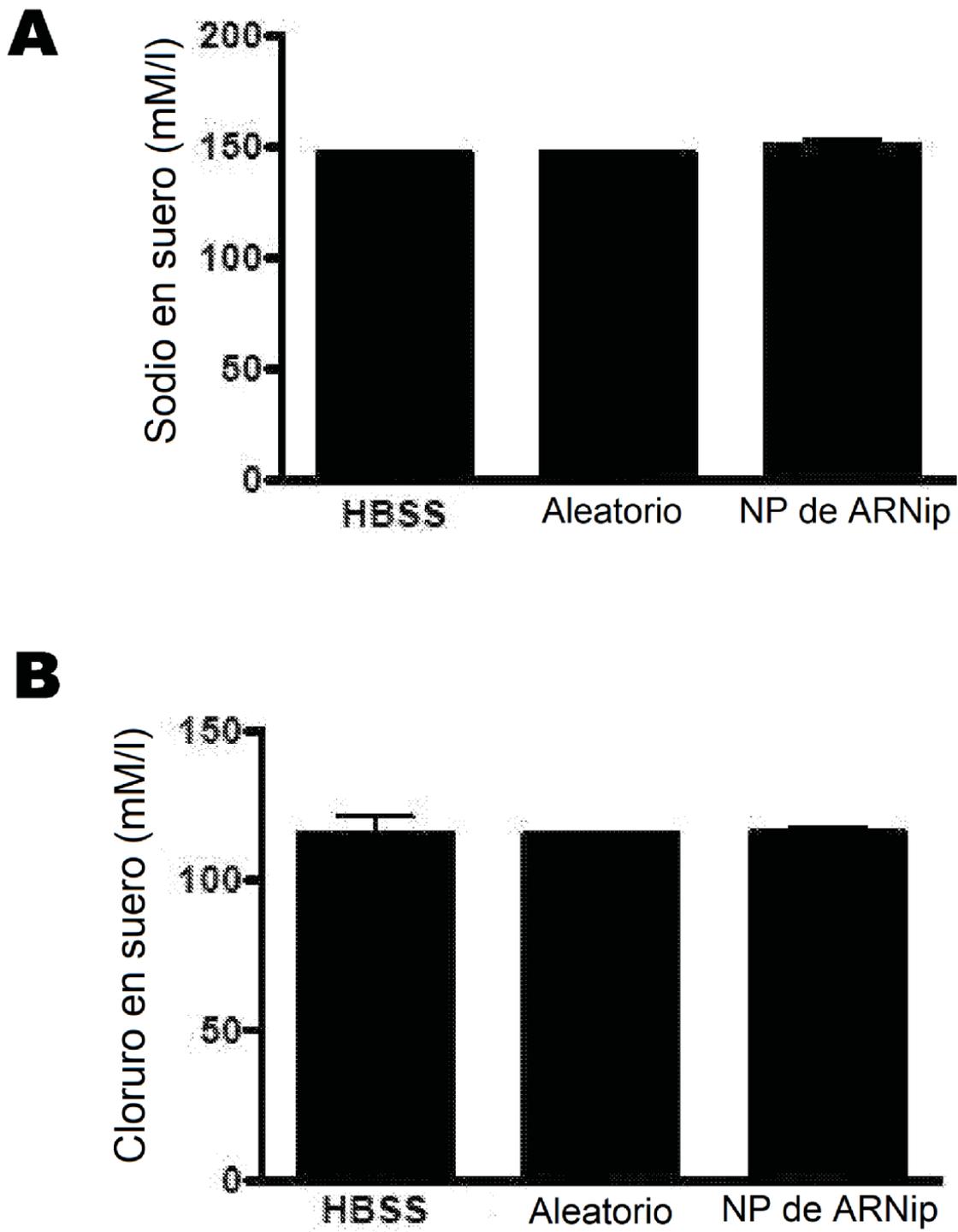
**D**



**FIG. 34**

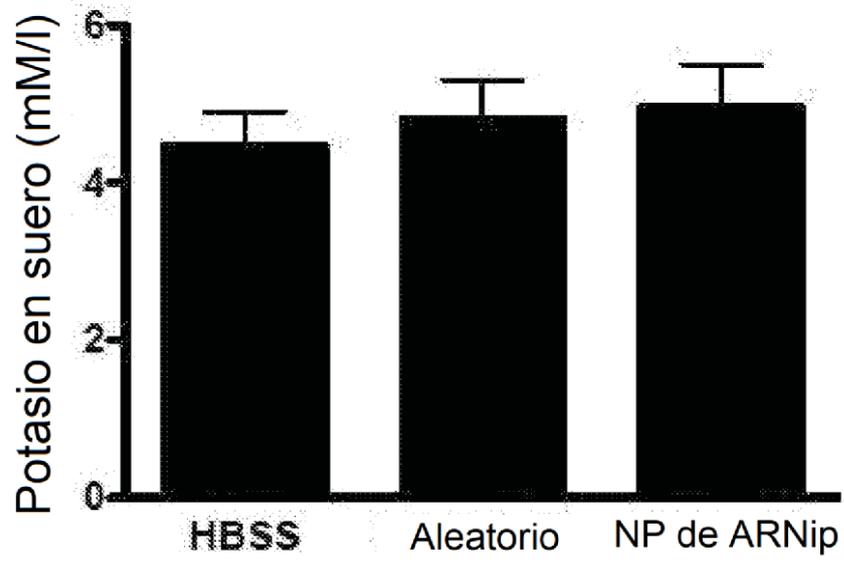


**FIG. 34E**

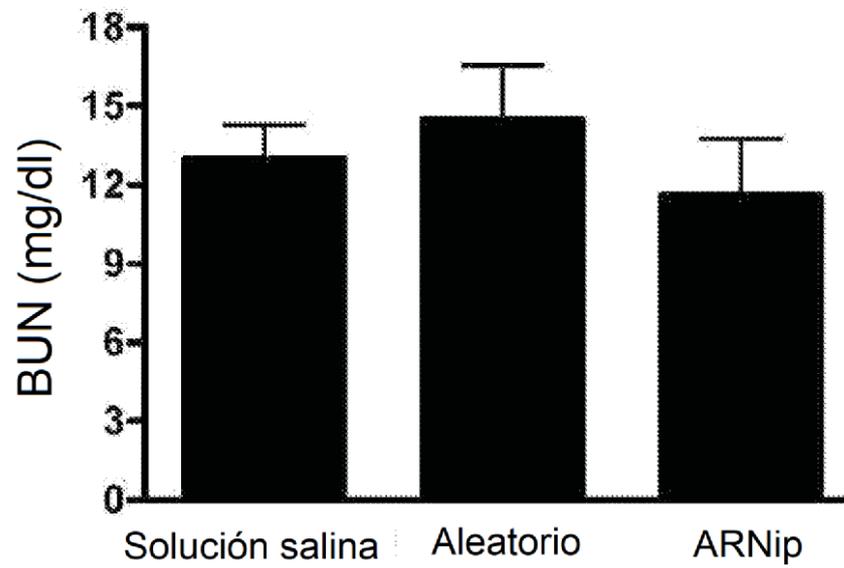


**FIG. 35**

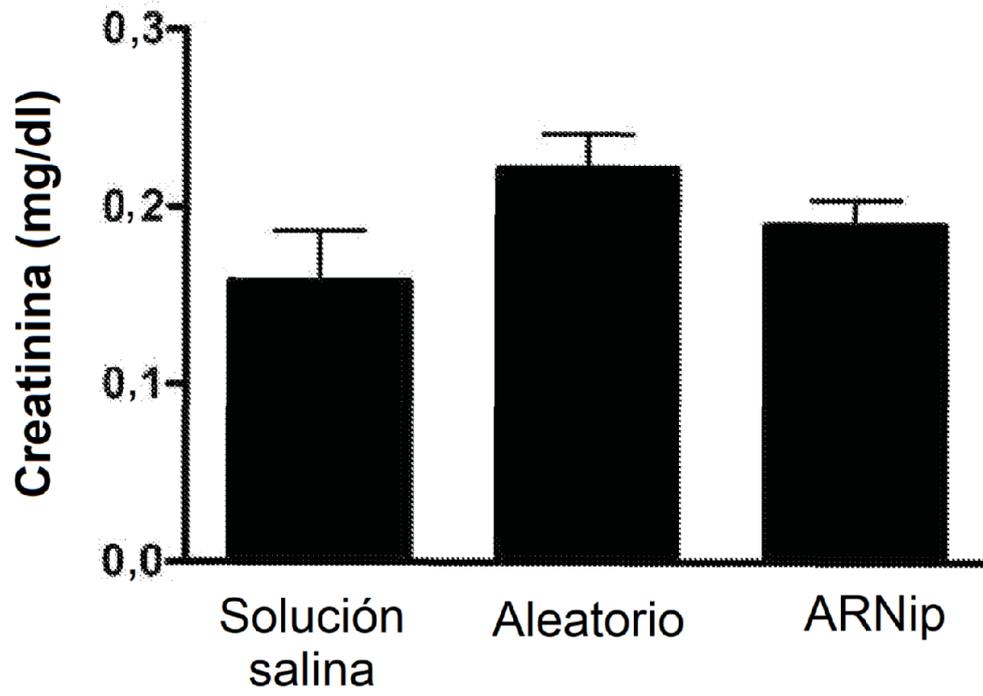
**C**



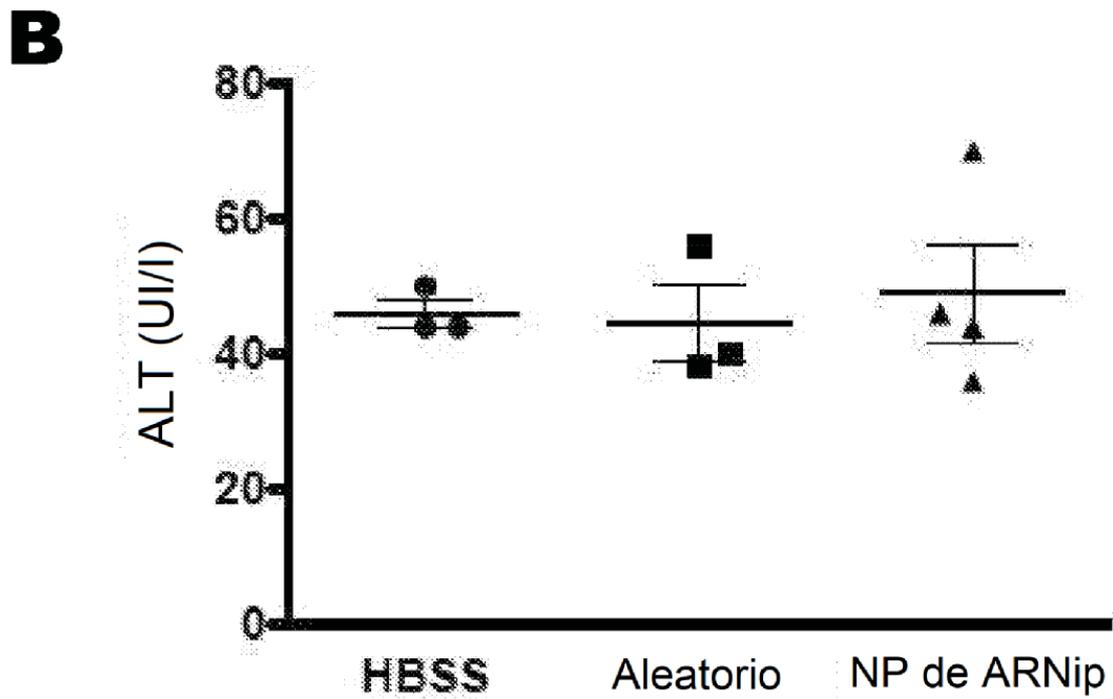
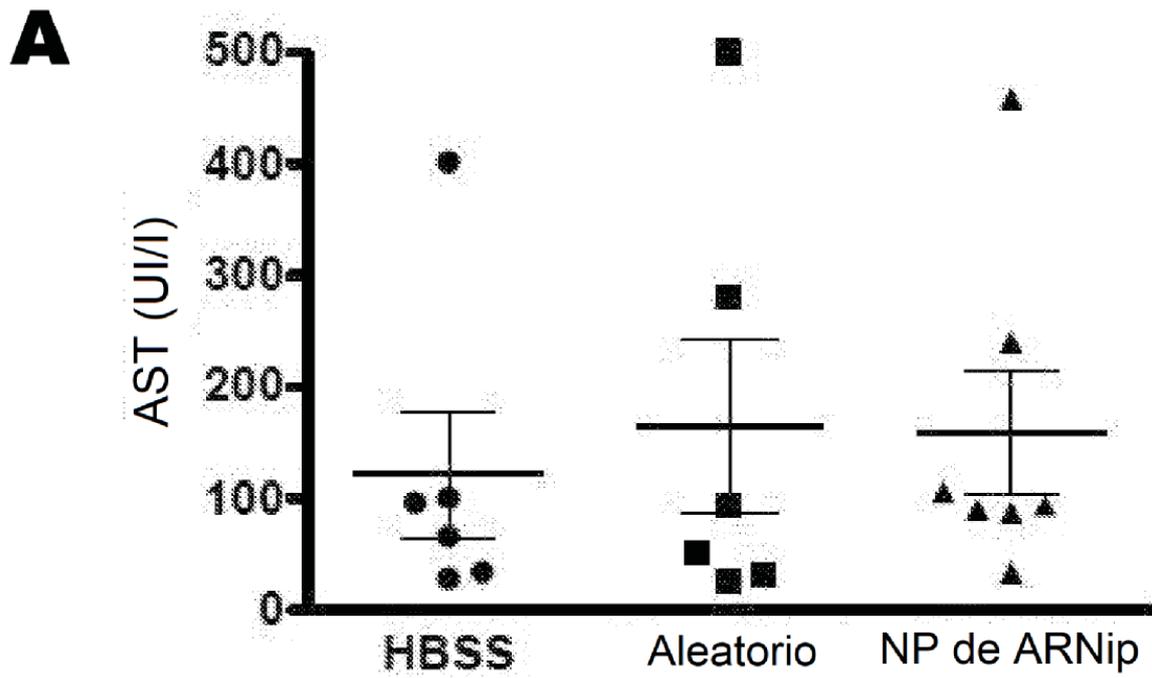
**D**



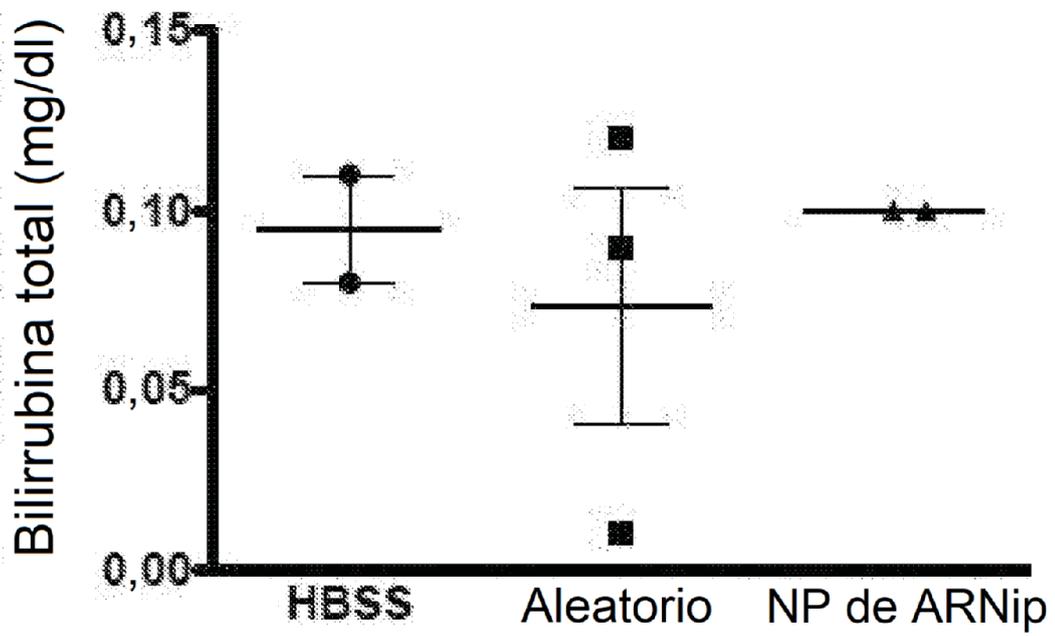
**FIG. 35**



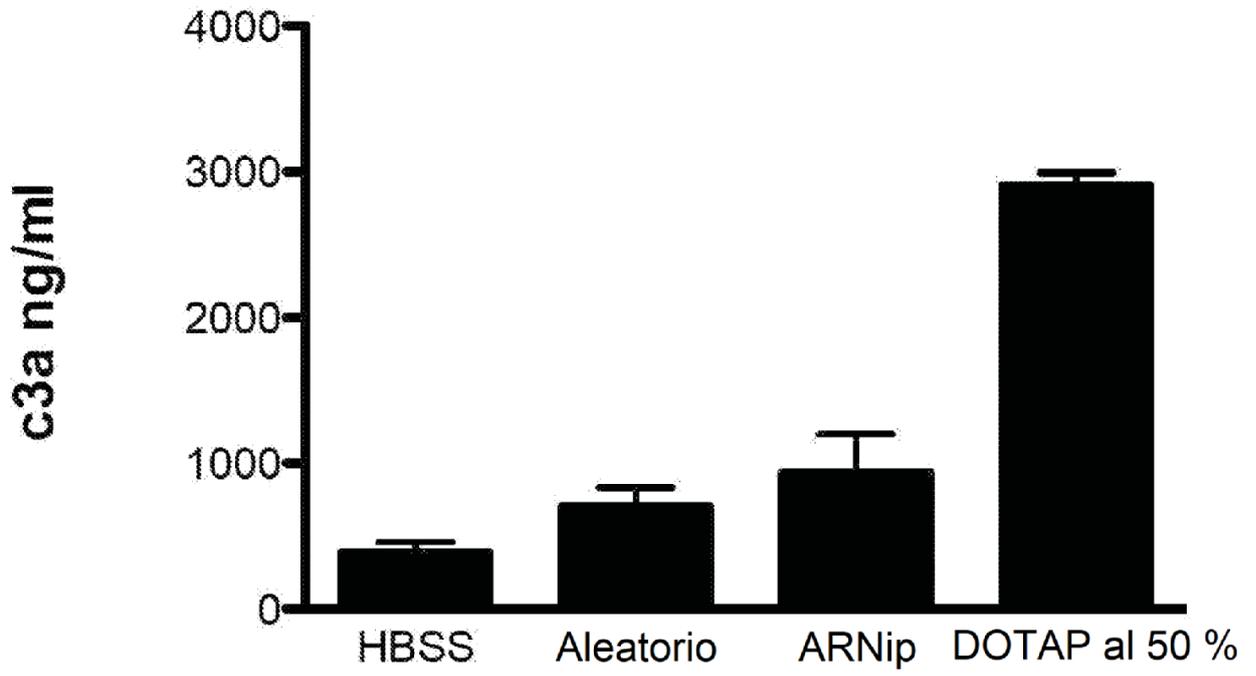
**FIG. 35E**



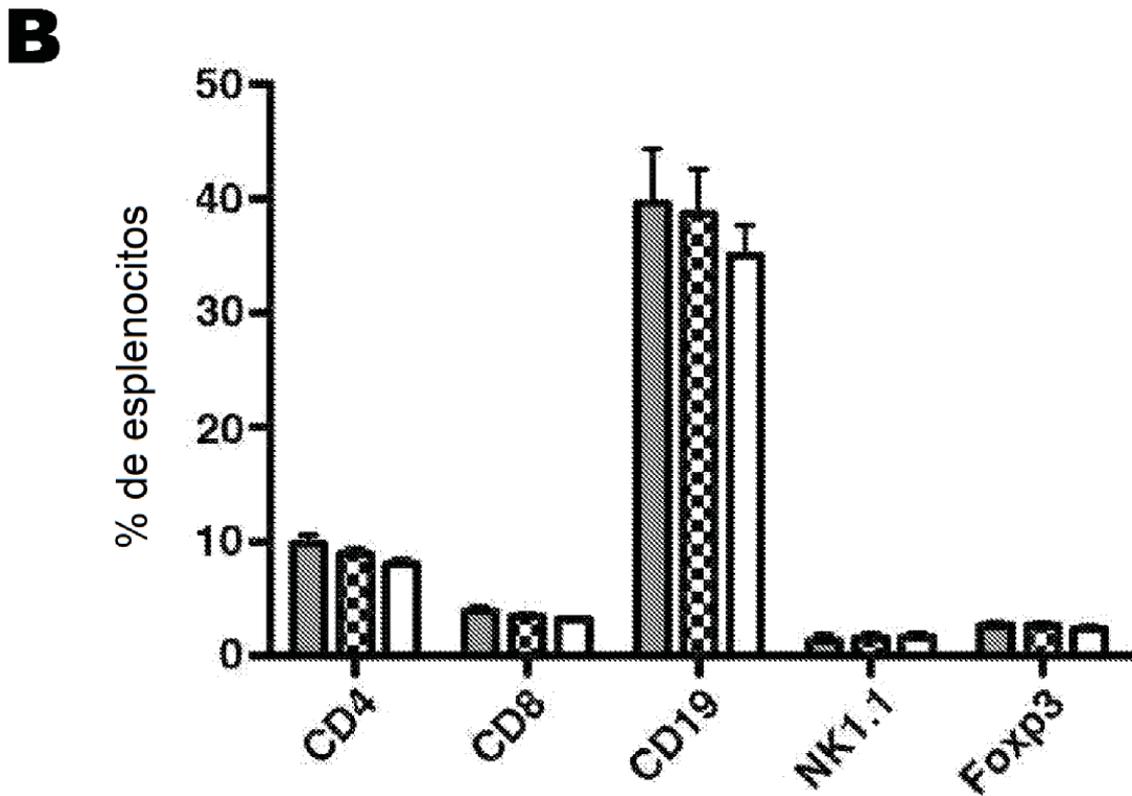
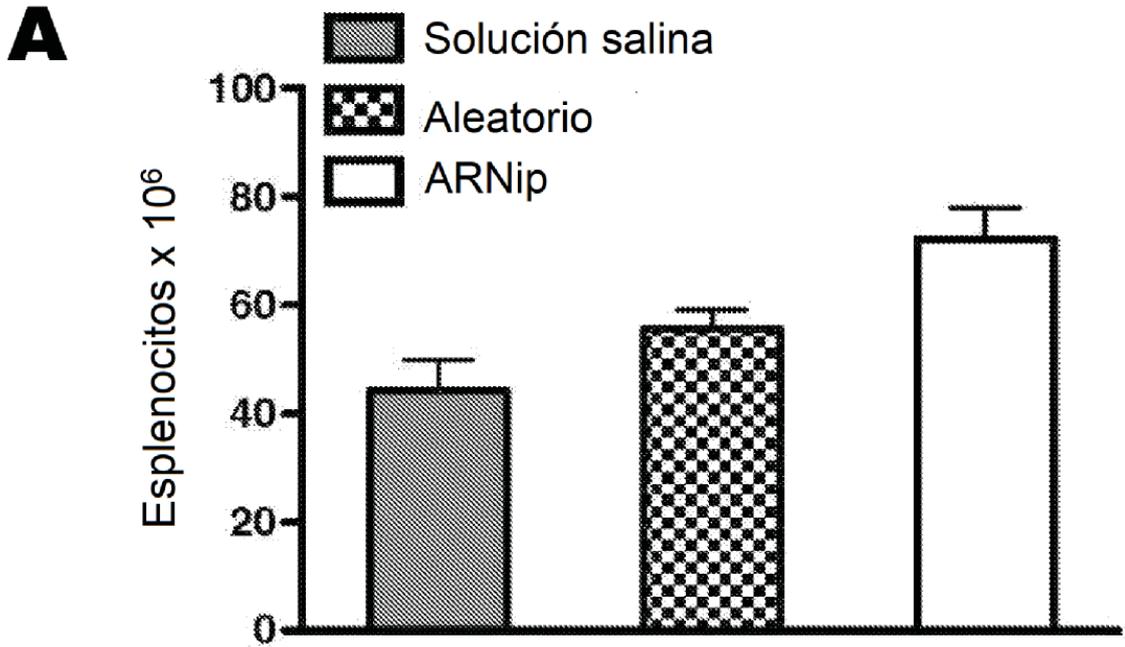
**FIG. 36**



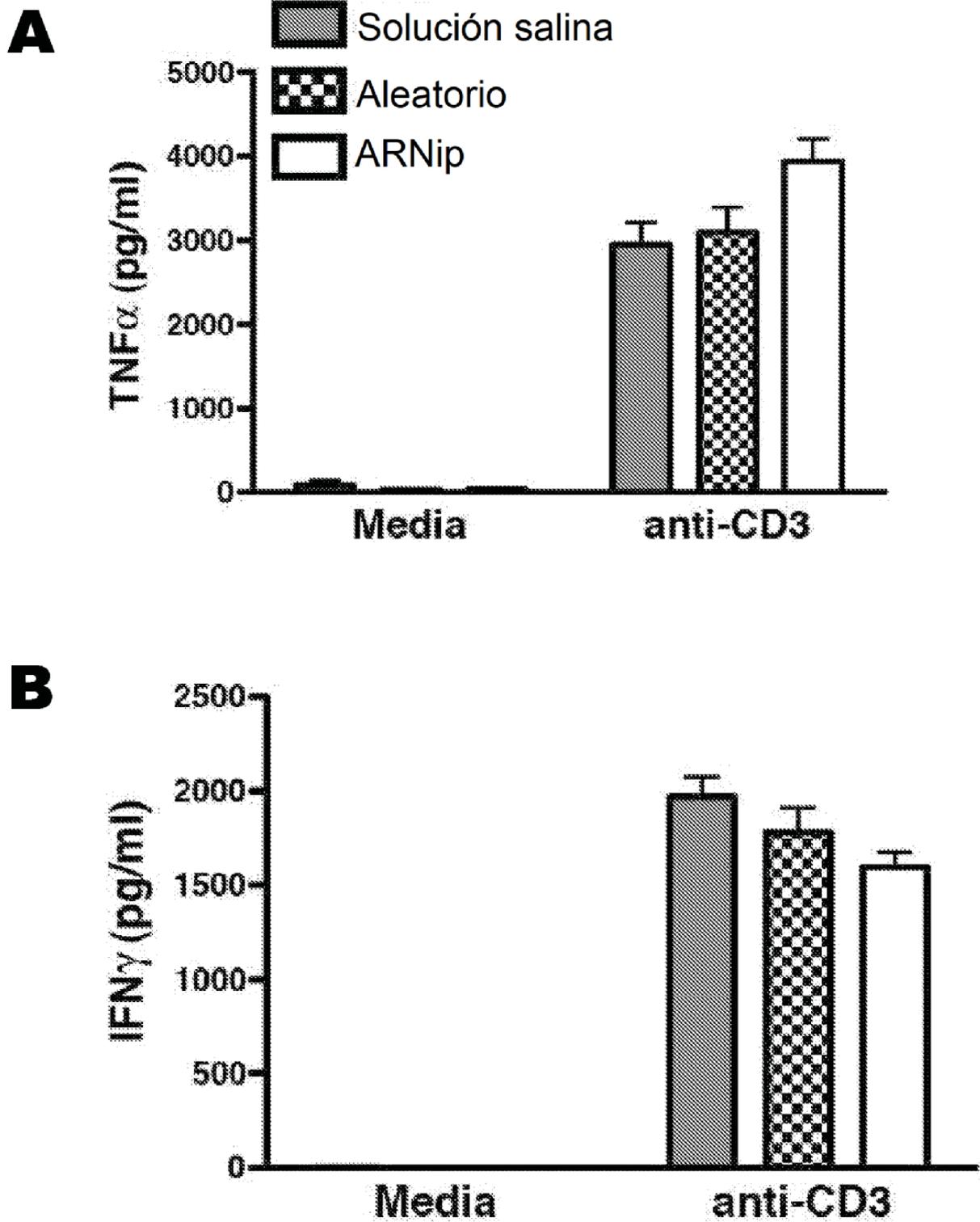
**FIG. 36C**



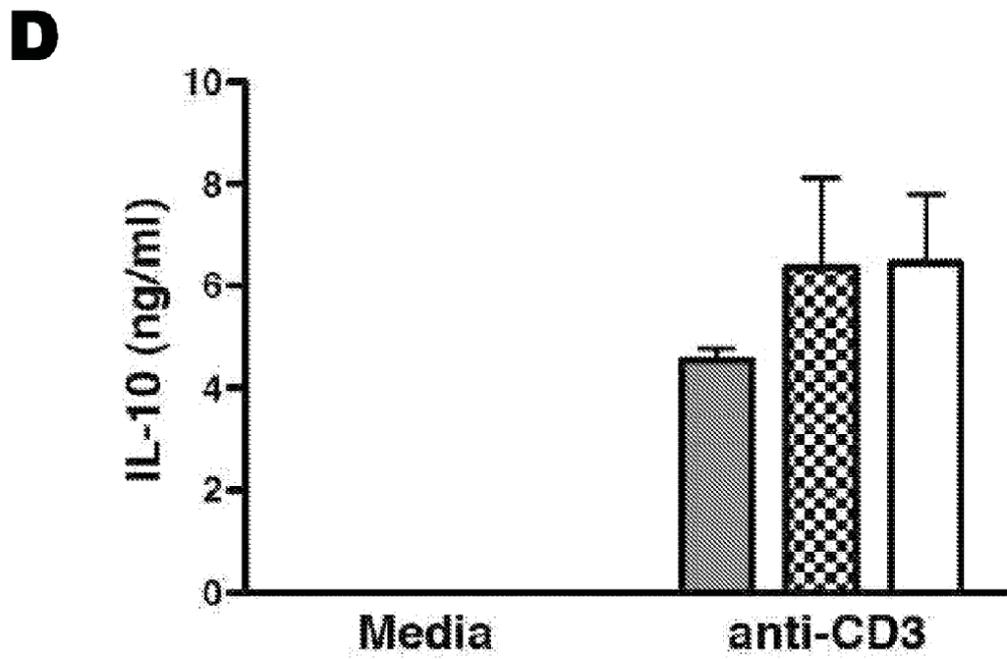
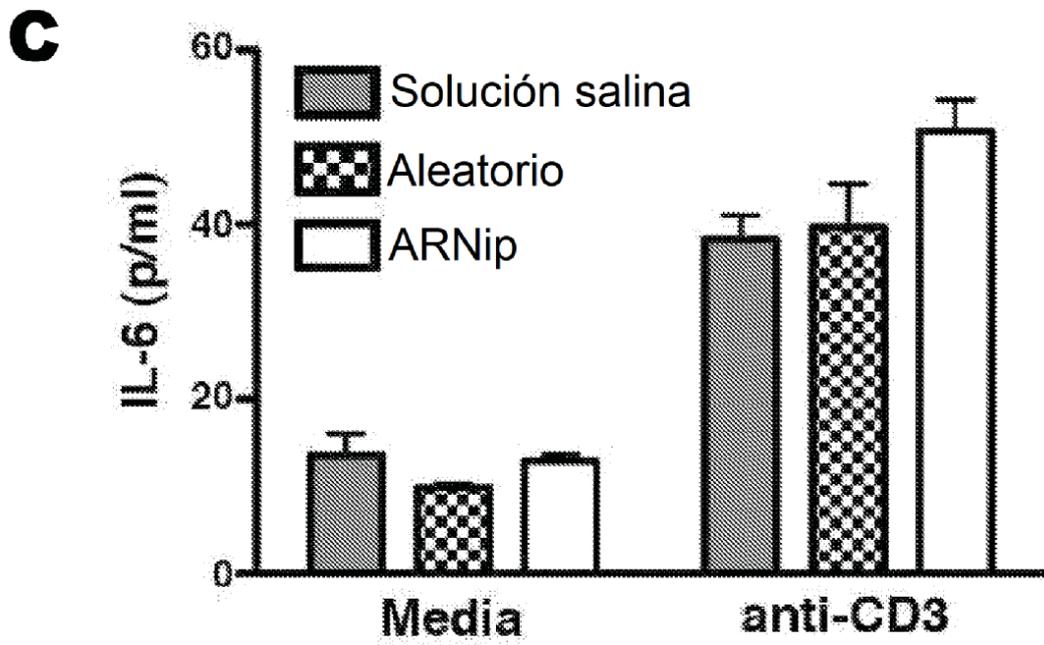
**FIG. 37**



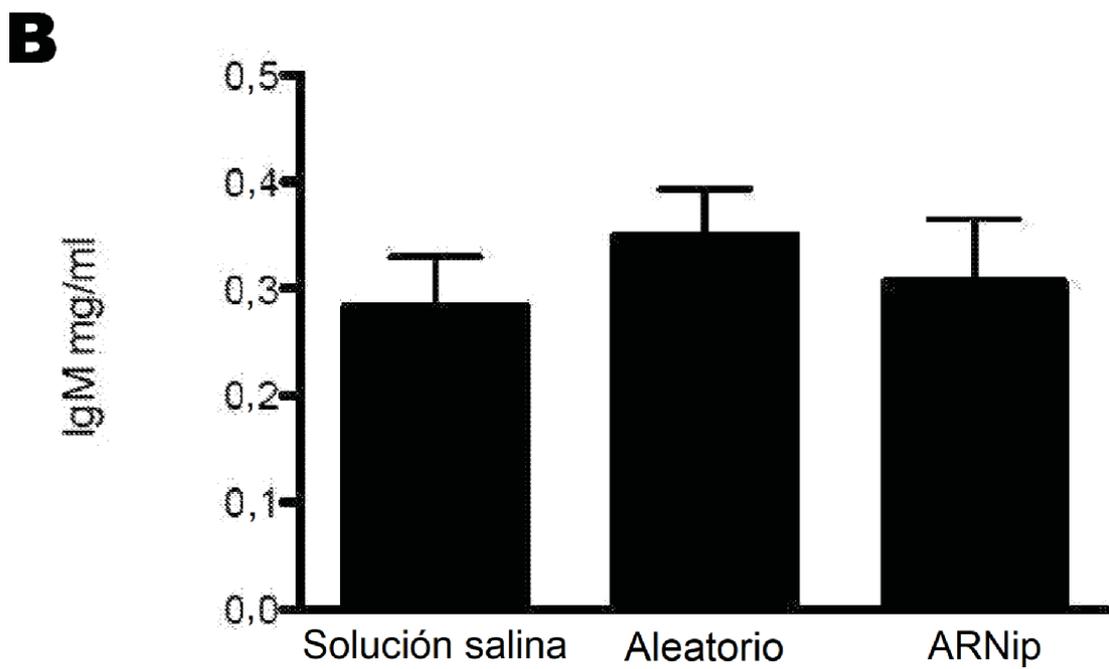
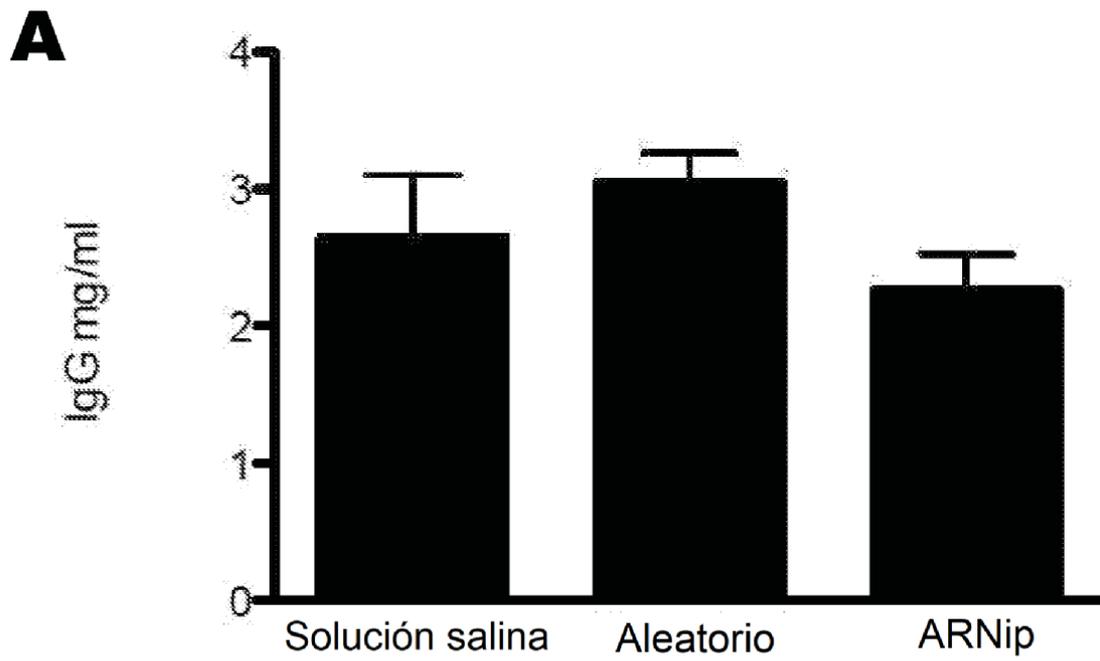
**FIG. 38**



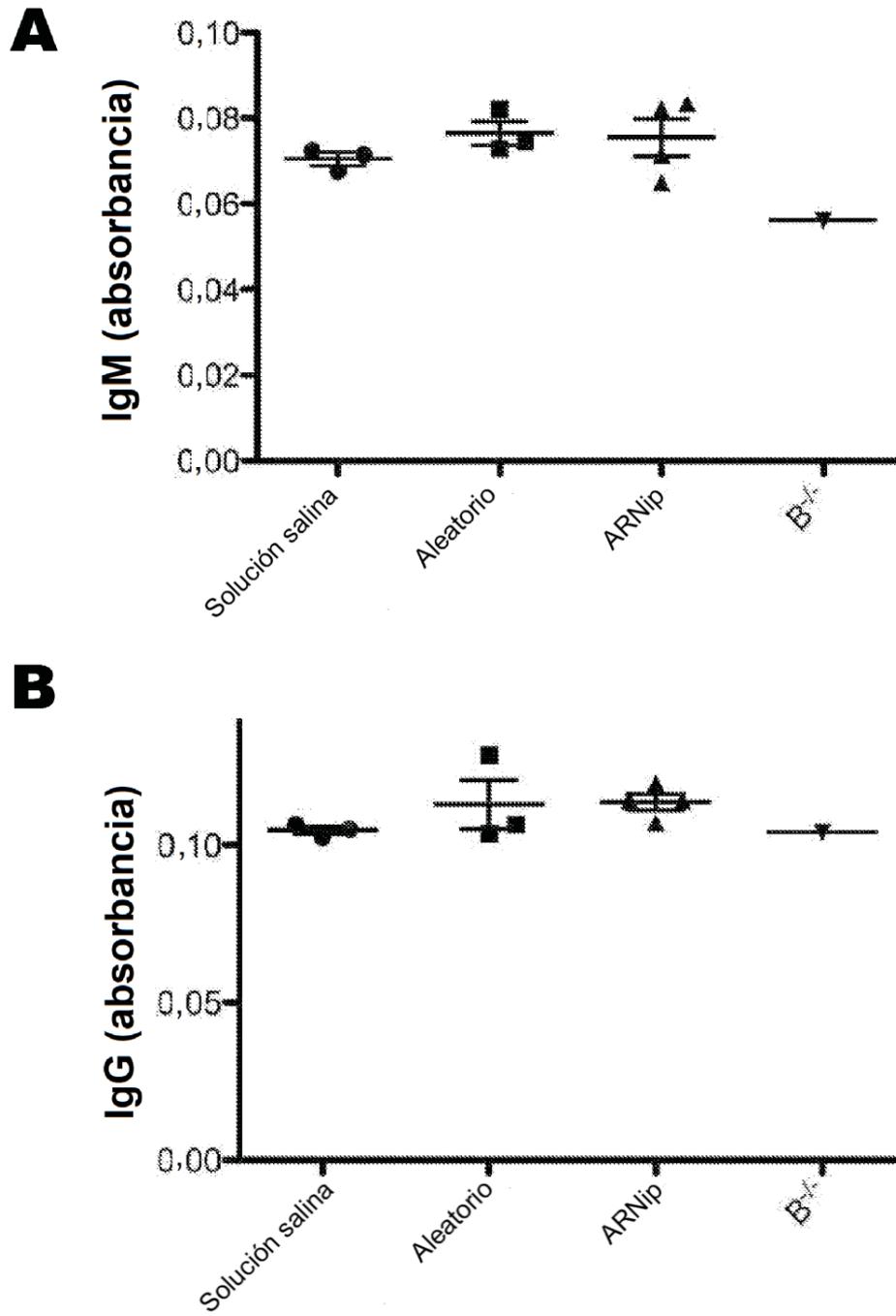
**FIG. 39**



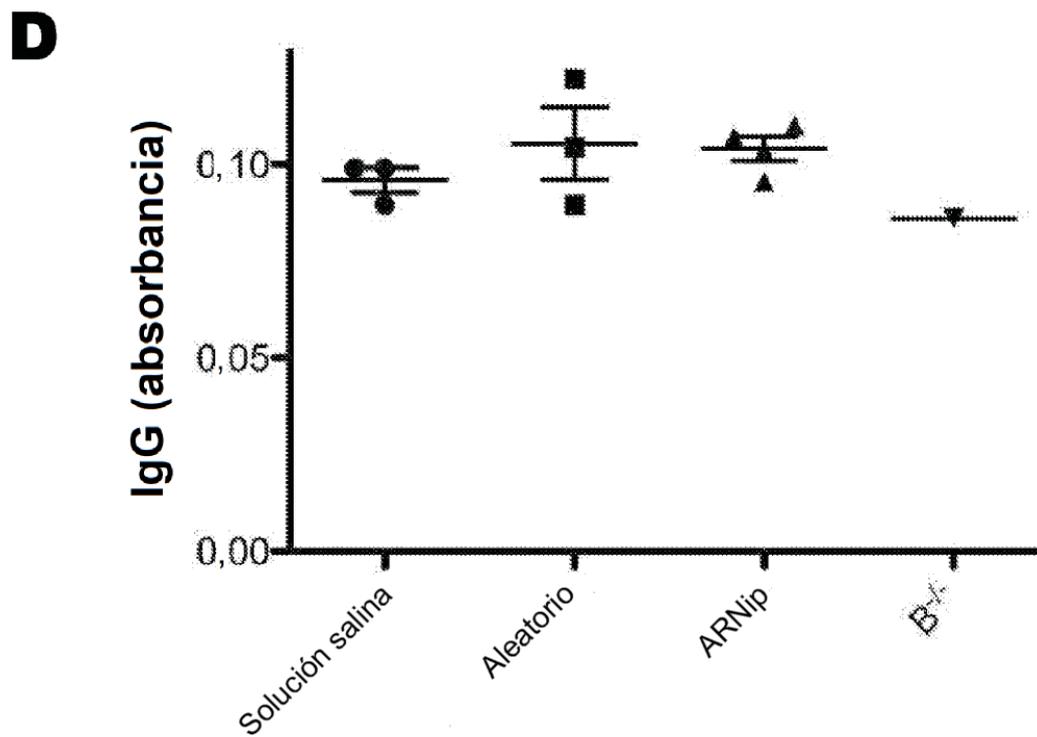
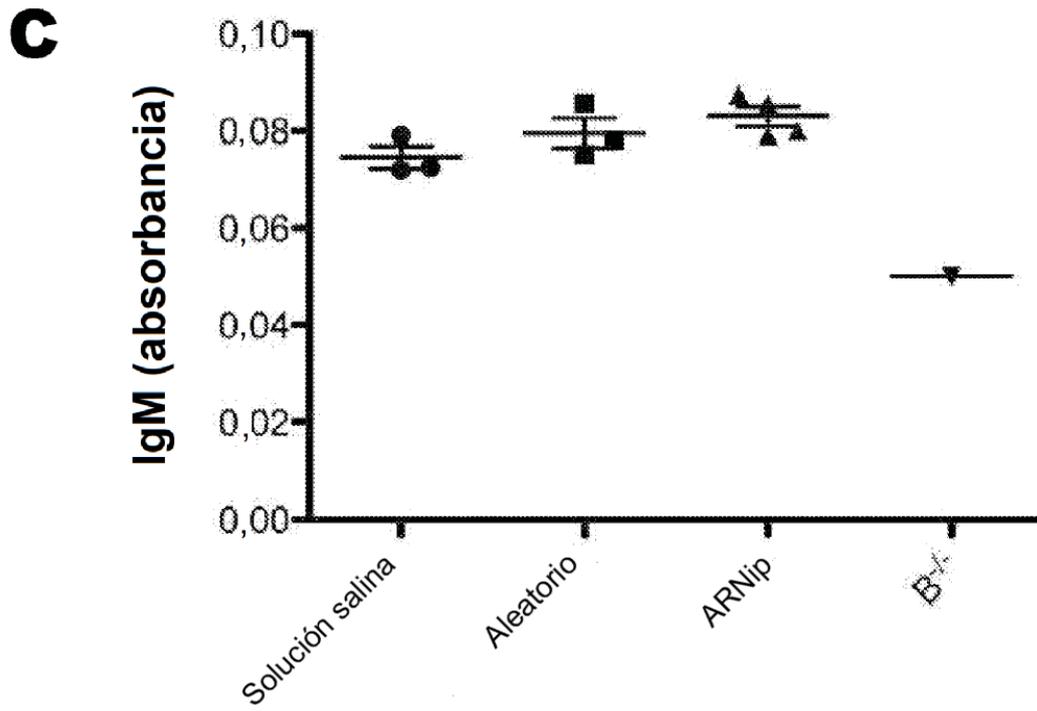
**FIG. 39**



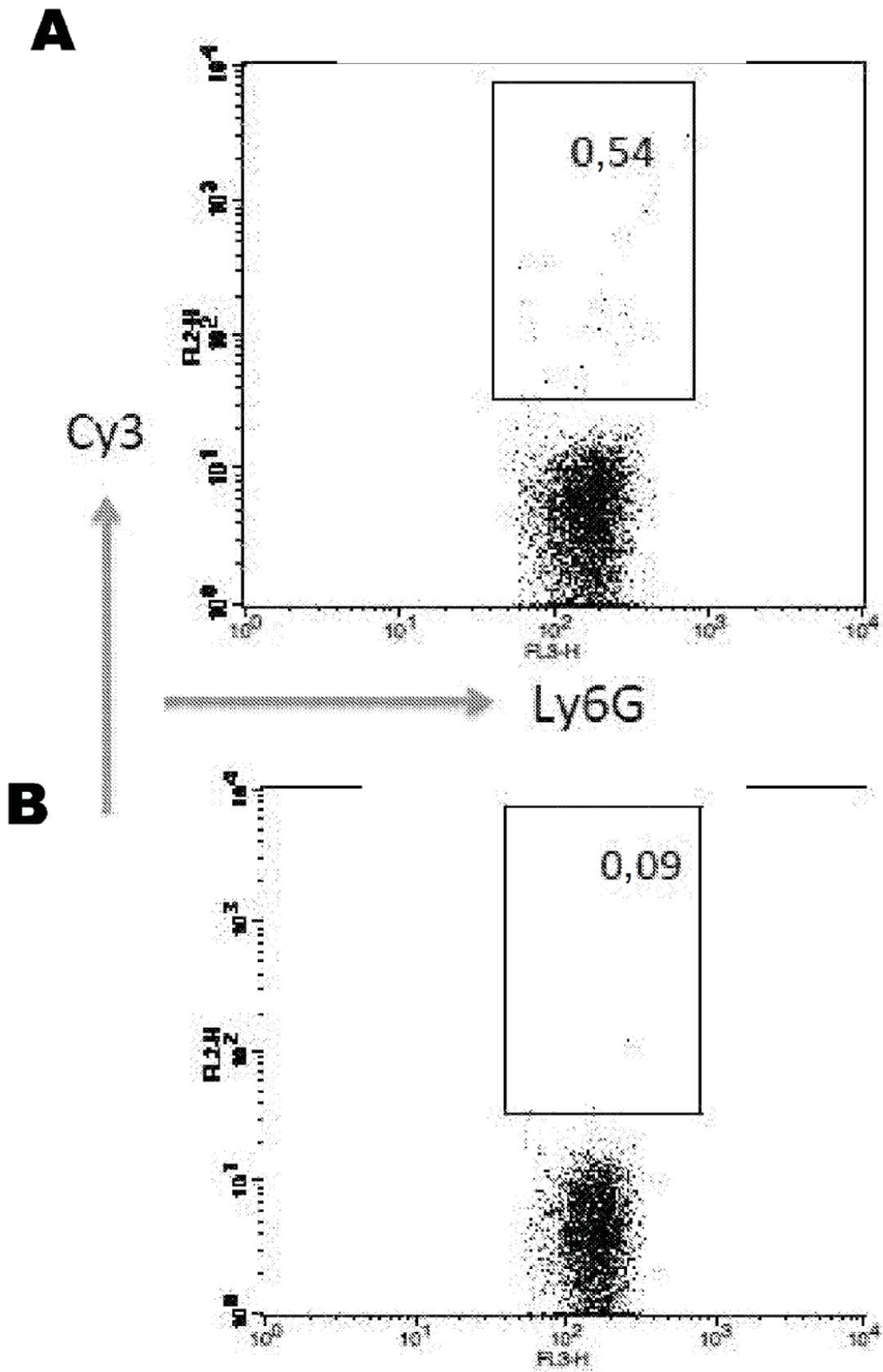
**FIG. 40**



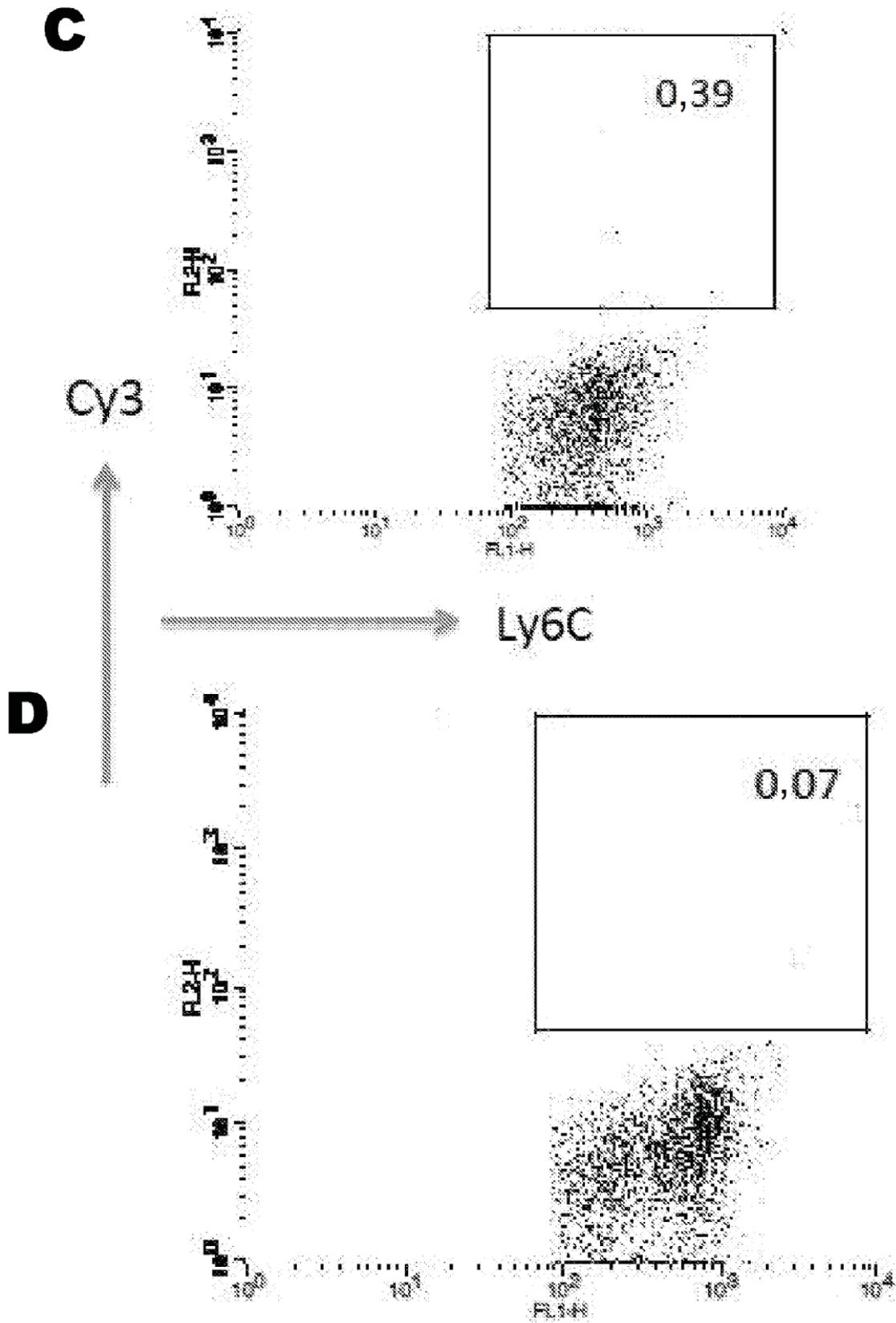
**FIG. 41**



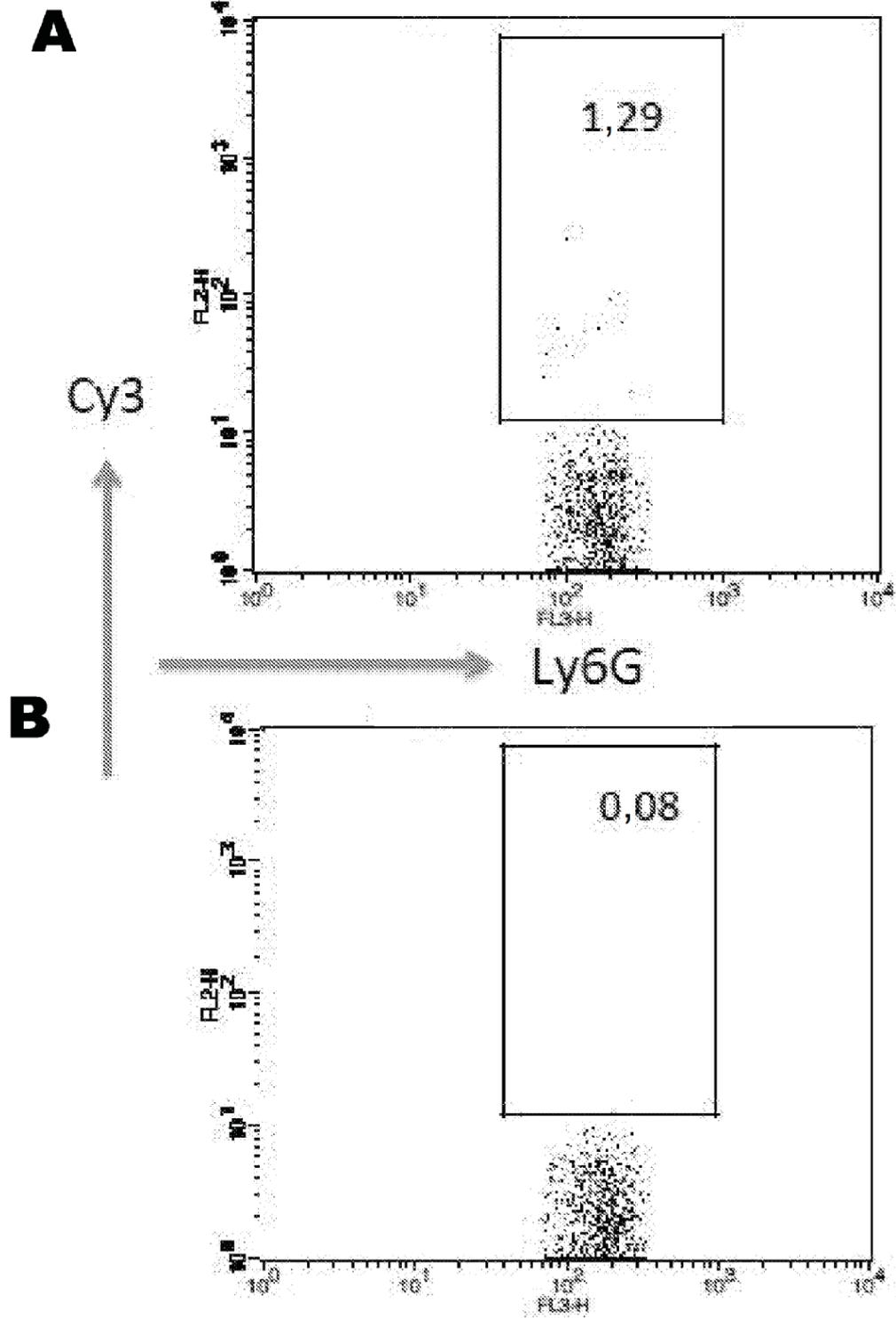
**FIG. 41**



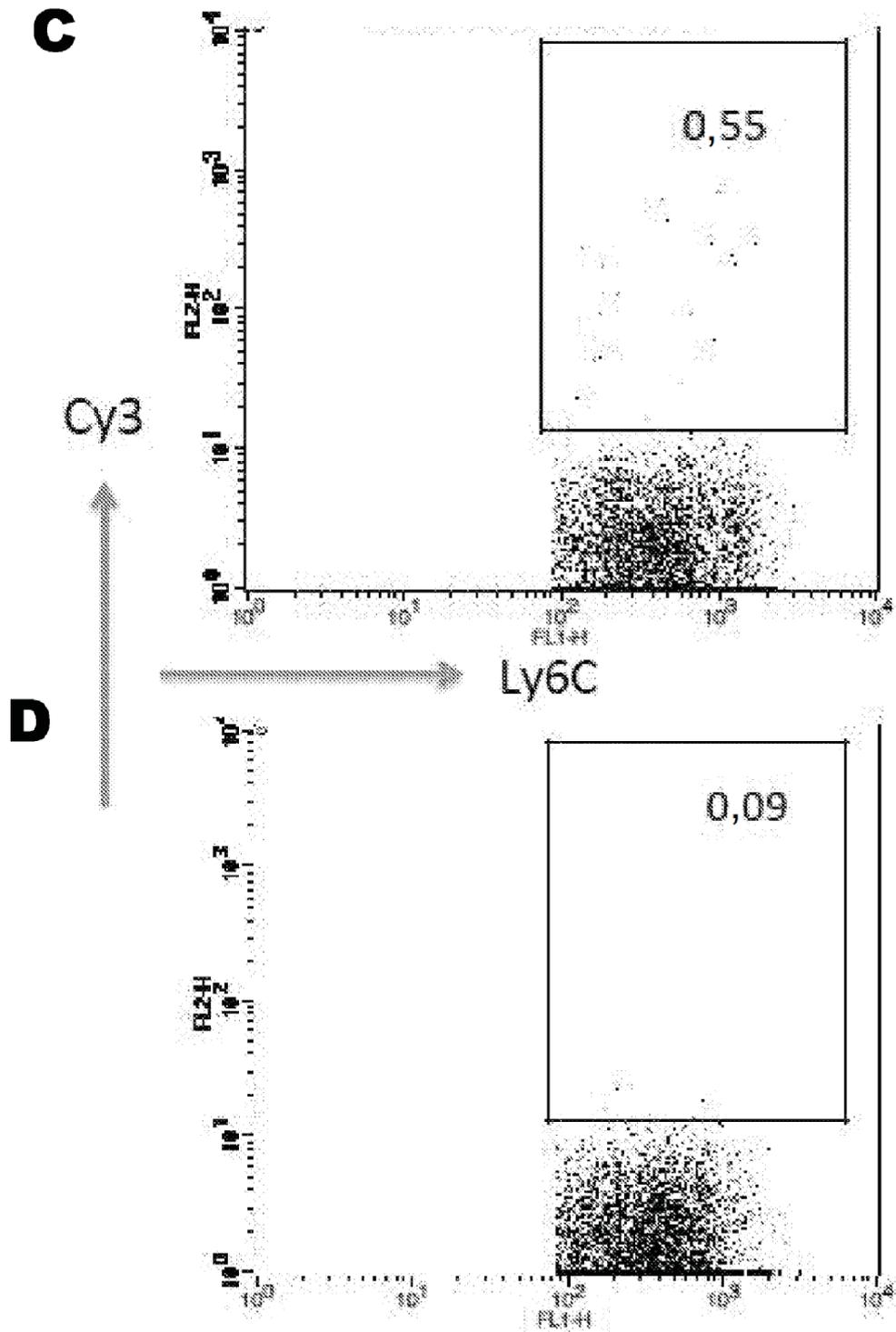
**FIG. 42**



**FIG. 42**



**FIG. 43**



**FIG. 43**