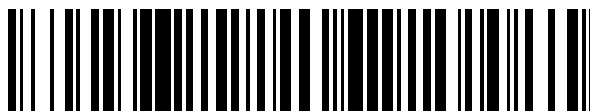


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **2 719 598**

51) Int. Cl.:

<b>A61K 47/64</b>	(2007.01)	<b>A61L 31/14</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/69</b>	(2007.01)	<b>A61L 27/34</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/88</b>	(2006.01)		
<b>C12N 9/02</b>	(2006.01)		
<b>A61K 47/34</b>	(2007.01)		
<b>A61K 48/00</b>	(2006.01)		
<b>A61K 9/51</b>	(2006.01)		
<b>A61L 27/54</b>	(2006.01)		
<b>A61L 31/16</b>	(2006.01)		
<b>A61L 31/10</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.05.2012 PCT/EP2012/002257**
- 87) Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013 WO13174409**
- 96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2012 E 12723622 (2)**
- 97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2854857**

54) Título: **Inmovilización reversible y/o liberación controlada de ácidos nucleicos contenidos en nanopartículas mediante revestimientos poliméricos (biodegradables)**

45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.07.2019**

73) Titular/es:  
**CUREVAC AG (100.0%)  
Paul-Ehrlich-Str. 15  
72076 Tübingen, DE**

72) Inventor/es:  
**BAUMHOF, PATRICK;  
WENDEL, HANS-PETER;  
NOLTE, ANDREA y  
WALKER, TOBIAS**

74) Agente/Representante:  
**AZNÁREZ URBIETA, Pablo**

ES 2 719 598 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

Inmovilización reversible y/o liberación controlada de ácidos nucleicos contenidos en nanopartículas mediante revestimientos poliméricos (biodegradables)

5

La presente invención se refiere a nanopartículas, tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas, que comprenden ácidos nucleicos, estando recubiertas las nanopartículas con un polímero biodegradable, que es un polímero de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada de las nanopartículas y, por tanto, del ácido nucleico. Además, la presente invención está dirigida a dispositivos médicos o de diagnóstico, en particular stents e implantes, que comprenden dichas nanopartículas para la inmovilización reversible y/o liberación controlada. Además, la presente invención está dirigida a dichas nanopartículas recubiertas y a dichos dispositivos médicos e implantes recubiertos con estas nanopartículas para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades, en particular en la prevención o tratamiento de restenosis, calcificación, reacción a cuerpos extraños e inflamación. Además, la presente invención está dirigida a un método para preparar una nanopartícula recubierta como se define en las reivindicaciones. Se describe aquí además un método para recubrir un ácido nucleico, comprendiendo nanopartículas con polímeros (biodegradables), y un método para recubrir dispositivos médicos o de diagnóstico con una composición que comprende dichas nanopartículas y un polímero (biodegradable).

20

La administración de medicamentos desempeña un papel importante en el desarrollo de formas de dosificación farmacéuticas para la industria del cuidado de la salud, ya que, a menudo, la duración de la liberación del medicamento debe extenderse durante días hasta varios meses. Esto se puede lograr mediante la incorporación de medicamentos en materiales poliméricos para controlar la liberación del medicamento a una velocidad predefinida y reproducible durante un período específico de tiempo.

25

En los últimos años, el interés por los polímeros biodegradables como sistemas de administración de fármacos, que controlan y prolongan la acción de los agentes terapéuticos, ha adquirido una importancia creciente. Especialmente los sistemas de administración basados en polímeros biodegradables son ventajosos, ya que no requieren ser retirados de los pacientes al final del período de tratamiento gracias a su degradación en compuestos fisiológicos que pueden degradarse del cuerpo. Esto proporciona beneficios significativos, especialmente en lo que respecta a la seguridad de los polímeros no biodegradables. Los polímeros biodegradables más atractivos y comúnmente utilizados son poliésteres tales como el ácido poli(láctico) (PLA), el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y la poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL). Estos materiales están comercialmente disponibles en diferentes composiciones y pesos moleculares que permiten controlar la degradación del polímero.

30

Para dispositivos médicos e implantes (por ejemplo stents, órganos artificiales, biosensores, catéteres, esqueletos para ingeniería tisular, válvulas cardíacas, etc.) tales polímeros biodegradables de suministro de medicamentos es de particular interés. Cuando estos dispositivos se implantan en el cuerpo, el cuerpo puede reaccionar de diferentes maneras, lo que puede resultar en un riesgo para el paciente. La lesión tisular resultante de la implantación del dispositivo puede, por ejemplo, inducir una respuesta inflamatoria. Esto podría terminar en una inflamación crónica. Se han descrito algunas posibilidades para resolver este problema, por ejemplo Onuki y col. describen la posibilidad de prevenir la inflamación cubriendo los implantes con microesferas de PLGA cargado con VEGF y dexametasona/hidrogel PVA (Onuki, Y., U. Bhardwaj, et al. (2008). A review of the biocompatibility of implantable devices: current challenges to overcome foreign body response." J Diabetes Sci Technol 2(6): 1003-15.)

35

40

Otro riesgo asociado a la introducción de dispositivos médicos e implantes es la inducción de una reacción de cuerpo extraño, lo que podría resultar en la necesidad de extraer el dispositivo.

45

Un problema adicional de los dispositivos médicos es la calcificación. La calcificación es el proceso por el cual el calcio mineral se acumula en los dispositivos implantables, pudiendo comprometer dramáticamente la función del dispositivo. Para evitar este proceso en el cuerpo, se han descrito varios fármacos unidos al dispositivo, entre otros, etanohidroxidifosfonato,  $\text{FeCl}_3$  y  $\text{AlCl}_3$ , levamisol (inhibidor de la fosfatasa alcalina) y sulfato de protamina y dexametasona (revisado en Onuki et al., ver más arriba).

50

La enfermedad de las arterias coronarias es la causa más común de morbilidad y mortalidad en el mundo, por ejemplo es responsable de 1 de cada 5 muertes en Estados Unidos. La cirugía de injerto de bypass de arteria coronaria ha demostrado ser un enfoque eficaz para la cardiopatía coronaria. En este contexto, un problema de particular importancia es la restenosis después de la implantación del stent. Los stents coronarios se utilizan en pacientes sometidos a revascularización coronaria. El stent implantado contacta directamente con la pared del vaso y sobresale hacia el tejido endovascular. Esto puede dañar el tejido vascular endotelial, dando como resultado una reacción inflamatoria que puede jugar un papel clave en el proceso de proliferación neointimal, lo que lleva a la restenosis.

55

La solución de este problema se encontró con los stents liberadores de fármacos, que liberan fármacos dirigidos contra el desarrollo de restenosis embebidos en polímeros liberadores de fármacos.

Los primeros polímeros utilizados para los stents liberadores de fármacos eran polímeros permanentes, lo que significa que no eran biodegradables. Pero resultó que estos polímeros estaban asociados con la reendotelialización retardada, la inflamación vascular localizada, las reacciones trombotogénicas y el deterioro de la funcionalidad, que puede deberse a una reacción de hipersensibilidad a la presencia del polímero permanente (revisado en Onuma, Y. J. Ormiston, et al. "Bioresorbable scaffold technologies." *Circ J* 75(3): 509-20). Para resolver este problema, se desarrollaron endoprótesis recubiertas con polímeros biodegradables, en particularmente basados en ácido poli(láctico) (PLA), ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y poli(q-caprolactona) (PCL).

Los medicamentos utilizados para prevenir la restenosis incluyen medicamentos inmunosupresores (por ejemplo sirolimus, everolimus, tacrolimus, ABT-578), medicamentos antiproliferativos (por ejemplo paclitaxel, antinomicina, angiopentina) y medicamentos antimigratorios (por ejemplo batimastat).

Tan solo hace pocos años, se han examinado también enfoques de terapia génica para prevenir la restenosis, por ejemplo la introducción de genes que codifican proteínas conocidas por destruir células en división, como timidina quinasa, citosina desaminasa, ligando Fas, CDK2, CDC3, ciclina B, inhibidores de CDK p21 y p27, p16-p27, p53, hRAD 50, etc., o proteínas que reducen la hiperplasia intimal, como receptor beta de PDGF, TIMP-1, PAI-1, etc. Además, parecen ser ventajosos para prevenir restenosis VEGF, sintetasas de óxido nítrico (eNOS y iNOS), inhibidor de trombina hiridun, TFPI, prostaciclina sintasa (PGIS) y COX-1. En otros estudios se ha examinado la introducción de ARN interferente antisentido o pequeño (ARNip) dirigido contra proteínas involucradas en el desarrollo de la restenosis, por ejemplo PDGF.

La mayoría de estos estudios se han realizado utilizando reactivos de transfección de lípidos catiónicos disponibles en el mercado, como Lipofectamine o Lipofectamine Plus. Pero el uso de estos lípidos catiónicos no es una opción clínicamente viable debido a la toxicidad conocida de los reactivos de transfección (Armeanu, S., J. Pelisek, et al. (2000). "Optimization of nonviral gene transfer of vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo." *Mol Ther* 1(4): 366-75).

Así, Cohen-Sack y col. llevaron a cabo estudios con nanopartículas basadas en PLGA que liberan PDGF-ARNsi en las células. Este sistema de administración se desarrolló para liberar ARNip en una célula durante un período de un mes (Cohen-Sacks, H., Y. Najajreh, et al. (2002). "Novel PDGFbetaR antisense encapsulated in polymeric nanospheres for the treatment of restenosis." *Gene Ther* 9(23): 1607-16). Por tanto, se usó PLGA como vehículo de transfección para administrar ARNsi en las células y no para recubrir un ácido nucleico que comprende nanopartículas para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada.

La WO 2011/026641 describe además el uso de conjugados de polietilenglicol/péptido para la transfección de ácidos nucleicos.

En un estudio reciente, Brito y col. describieron la inmovilización de lipoplexos que contienen ADN plasmídico que codifica eNOS en stents utilizando recubrimientos de gelatina. Así, los lipoplexos que contienen ácido nucleico se diluyeron en gelatina y se fijaron en el stent por secado al aire. Posteriormente se usó PLGA disuelto en acetona para recubrir la capa de gelatina con el fin de evitar cualquier disolución prematura de la capa de gelatina durante la implantación (Brilo, L. y M. Amiji (2007). "Nanoparticulate carriers for the treatment of coronary restenosis." *Int J Nanomedicine* 2(2): 143-61). Se informó de resultados similares en Brito L. y col.: "Non-viral eNos gene delivery and transfection with stents for the treatment of restenosis", *Biomedical Engineering Online*, vol. 9, nº 1 (2010).

Las nanopartículas basadas en PLGA también se han descrito y revisado en Danhier y col. ("PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications"; *Journal of Controlled Release*; vol. 161, no. 2 (2012), 505-522).

Aunque se ha avanzado mucho en este campo, todavía existe la necesidad de posibilidades para combinar vehículos de transfección eficientes (particularmente basados en péptidos/proteínas catiónicos y polímeros) de liberación controlada y/o de inmovilización de ácidos nucleicos, en particular para su uso con dispositivos médicos o de diagnóstico. Hasta ahora no ha sido posible inmovilizar nanopartículas que contienen un ácido nucleico hidrofílico basadas en péptidos/proteínas catiónicas o polímeros con polímeros biodegradables, como PLGA, para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada del fármaco debido a su insolubilidad en disolventes no orgánicos.

Así, el objetivo subyacente a la presente invención es proporcionar medios que permitan la inmovilización reversible y/o la liberación controlada de ácidos nucleicos evitando al mismo tiempo preferiblemente las desventajas mencionadas anteriormente.

Este objetivo es resuelto por la materia de la presente invención, preferentemente por el objeto de las reivindicaciones adjuntas. En particular, de acuerdo con la primera realización de la presente invención, el objetivo anterior es resuelto por nanopartículas (= complejo de carga de portador polimérico) basados en un complejo de un ácido nucleico, ADN o ARN, y una molécula portadora polimérica según la fórmula genérica (I) recubierta con un polímero biodegradable, donde el polímero biodegradable es PLGA, para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada de medicamentos.

En este contexto, los inventores han encontrado sorprendentemente que los ácidos nucleicos hidrófilos, si están comprendidos en nanopartículas basadas en una molécula portadora polimérica de acuerdo con la fórmula genérica (I), pueden disolverse en disolventes orgánicos o mezclarse con disolventes orgánicos con bajo contenido en agua sin una pérdida significativa de la integridad fisicoquímica de las nanopartículas y particularmente del ácido nucleico comprendido en ellas y de su eficiencia biológica. Esto permite que la mezcla con aquellos polímeros (por ejemplo, biodegradables) que sólo son solubles en disolventes orgánicos (o al menos en disolventes que comprenden un alto porcentaje de un disolvente orgánico) genere soluciones homogéneas que puedan utilizarse para la inmovilización reversible de dicho ácido nucleico conteniendo nanopartículas en una matriz biodegradable por diferentes métodos de recubrimiento (por ejemplo recubrimiento por inmersión, secado por pulverización, recubrimiento por flujo, recubrimiento por centrifugación). Dichas nanopartículas inmovilizadas pueden utilizarse para la liberación controlada de fármacos.

Las nanopartículas de la invención recubiertas con un polímero biodegradable para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada de fármacos comprenden un recubrimiento con un polímero biodegradable, siendo el polímero biodegradable un polímero de PLGA, un ácido nucleico, ADN o ARN, como carga y un portador polimérico de acuerdo con la fórmula (I):

15 **L-P<sup>1</sup>-S-[S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub>-S-P<sup>3</sup>-L**

donde

P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup> iguales o diferentes entre sí, representan una cadena polimérica hidrófila lineal o ramificada, presentando cada P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup> al menos una porción -SH capaz de formar un enlace disulfuro después de la condensación con el componente P<sup>2</sup>, o alternativamente con (AA)x' o [(AA)x]z si tales componentes se usan como un enlazante entre P<sup>1</sup> y P<sup>2</sup> o P<sup>3</sup> y P<sup>2</sup> y/o con otros componentes (por ejemplo (AA)x, [(AA)x]z o L), seleccionándose la cadena polimérica hidrófila ramificada o lineal, independientemente, de entre polietilenglicol (PEG), poli-N-(2-hidroxi)propilmetacrilamida, poli-2-(metacrililoiloxi)etilfosforilcolinas, poli(hidroxi)alquil-L-asparagina, poli-(2-(metacrililoiloxi)etil-fosforilcolina), hidroxietilalmidón o poli(hidroxi)alquil-L-glutamina, donde la cadena polimérica hidrófila tiene un peso molecular de aproximadamente 1 kDa a aprox. 100 kDa, preferentemente de alrededor de 2 kDa a aproximadamente 25 kDa, o con especial preferencia de alrededor de 2 kDa a aproximadamente 10 kDa, por ejemplo alrededor de 5 kDa o aproximadamente 25 kDa o de 5 kDa o alrededor de 10 kDa;

P<sup>2</sup> es un péptido o proteína catiónico o policatiónico, preferentemente de una longitud de aproximadamente 3 a alrededor de 100 aminoácidos, en especial de alrededor de 3 a aproximadamente 50 aminoácidos, en particular de alrededor de 3 a aproximadamente 25 aminoácidos, por ejemplo una longitud de 3 a 10, 5 a 15, 10 a 20 ó 15 a 25 aminoácidos, con especial preferencia una longitud de alrededor de 5 a aproximadamente 20 y con total preferencia una longitud de alrededor de 10 a aproximadamente 20; un polímero catiónico o policatiónico que tiene típicamente un peso molecular de alrededor de 0,5 kDa a aproximadamente 30 kDa, incluyendo un peso molecular de aproximadamente 1 kDa a alrededor de 20 kDa, preferentemente de alrededor de 1,5 kDa a aproximadamente 10 kDa, o con un peso molecular de alrededor de 0,5 kDa a aproximadamente 100 kDa, incluyendo un peso molecular de alrededor de 10 kDa a aproximadamente 50 kDa, en especial de alrededor de 10 kDa a aproximadamente 30 kDa; presentando cada P<sup>2</sup> al menos dos porciones -SH capaces de formar un enlace disulfuro después de la condensación con otros componentes P<sup>2</sup> o componente(s) P<sup>1</sup> y/o P<sup>3</sup> o alternativamente con otros componentes (por ejemplo (AA)x', or [(AA)x]z).

-S-S- es un enlace (reversible) disulfuro (se omiten los paréntesis para mejor lectura), donde S representa preferentemente azufre o una porción portadora de -SH que forma un enlace (reversible) disulfuro. El enlace (reversible) disulfuro se forma preferentemente por condensación de las partes -SH de los componentes P<sup>1</sup> y P<sup>2</sup>, P<sup>2</sup> y P<sup>2</sup> o y P<sup>2</sup> y P<sup>3</sup>, u opcionalmente de componentes adicionales como los aquí definidos (por ejemplo L, (AA)x, [(AA)x]z, etc.); la parte -SH puede ser parte de la estructura de estos componentes o añadirse mediante una modificación como se define más abajo;

L es un ligando opcional, que puede estar presente o no, y se puede seleccionar, independientemente, de entre RGD, transferrina, folato, un péptido señal o una secuencia de señal, una señal o secuencia de localización, una señal o secuencia de localización nuclear (NLS), un anticuerpo, un péptido de penetración celular (por ejemplo TAT o KALA), un ligando de un receptor (por ejemplo citoquinas, hormonas, factores de crecimiento, etc.), moléculas pequeñas (por ejemplo carbohidratos tales como manosa o galactosa o ligandos sintéticos), agonistas de moléculas pequeñas, inhibidores o antagonistas de receptores (por ejemplo análogos de péptido mimético RGD, etc.);

n es un entero seleccionado típicamente de un intervalo de alrededor de 1 a 50, preferentemente de un intervalo de alrededor de 1, 2 ó 3 a 30, en especial de un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4 ó 5 a 25, o un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4 ó 5 a 20, o un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4 ó 5 a 15, o un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4 ó 5 a 10, incluyendo por ejemplo un intervalo de alrededor de 4 a 9, 4 a 10, 3 a 20, 4 a 20, 5 a 20 ó 10 a 20, o un intervalo de alrededor de 3 a 15, 4 a 15, 5 a 15 ó 10 a 15, o un intervalo de alrededor de 6 a 11 ó 7 a 10. En especial, n está en un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4 ó 5 a 10, muy preferiblemente en un intervalo de alrededor de 1, 2, 3 ó 4 a 9, en un intervalo de alrededor de 1, 2, 3 ó 4 a 8, o en un intervalo de alrededor de 1, 2 ó 3 a 7.

Estos ácidos nucleicos que comprenden nanopartículas basadas en el vehículo polimérico de acuerdo con la fórmula (I) también se denominan aquí complejos de carga de vehículo polimérico.

La molécula portadora polimérica de la invención de acuerdo con la fórmula genérica (I) se prepara por una nueva estrategia de síntesis y ventajosamente permite definir la longitud de la cadena polimérica y combinar propiedades deseadas de los diferentes polímeros (cortos) en un polímero, por ejemplo para compactar eficientemente ácidos nucleicos con el propósito de una transfección eficiente de ácidos nucleicos para la terapia génica u otras aplicaciones terapéuticas, sin pérdida de actividad, en particular para la transfección eficiente de un ácido nucleico en diferentes líneas celulares *in vitro* pero también *in vivo*. La molécula portadora polimérica de la invención además no es tóxica para las células y proporciona una liberación eficiente de su carga de ácido nucleico. Finalmente, muestra una resistencia mejorada a la aglomeración debido a la adición reversible de las cadenas poliméricas hidrófilas (por ejemplo monómeros PEG) en particular en los extremos terminales de la molécula portadora polimérica de la invención de acuerdo con la fórmula genérica (I), que además confiere una estabilidad incrementada de la carga de ácido nucleico con respecto a los medios que contienen suero e impiden el reconocimiento del complejo de carga portador polimérico por el sistema inmunológico.

Además, la molécula portadora polimérica de la invención de acuerdo con la fórmula genérica (I) permite variar considerablemente su contenido en péptidos o polímeros y así modular sus propiedades biofísicas/bioquímicas, en particular las propiedades catiónicas del componente  $[S-P^2-S]_n$ , muy fácilmente y rápido, por ejemplo incorporando como componentes  $P^2$  los mismos o diferentes péptidos catiónicos, proteínas o polímeros y opcionalmente añadiendo otros componentes, por ejemplo componentes aminoácidos  $(AA)_x$ , en el componente repetitivo  $[S-P^2-S]$  para formar un componente repetitivo modificado tal como  $\{[S-P^2-S]_a/[S-(AA)_x-S]_b\}$  como un motivo central del portador polimérico de la invención (siendo  $a + b = n$ , véase abajo). Incluso a pesar de que consiste en unidades monoméricas no tóxicas bastante pequeñas, la molécula portadora polimérica de la invención forma una secuencia de unión catiónica con una longitud de cadena definida, proporcionando una fuerte condensación de la carga de ácido nucleico y estabilidad del complejo. Bajo las condiciones reductoras del citosol (por ejemplo GSH citosólico), el complejo es rápidamente degradado en sus monómeros, los cuales se degradan además (por ejemplo oligopéptidos) o se secretan (por ejemplo PEG). Esto facilita la liberación de la carga de ácido nucleico en el citosol. Gracias a la degradación en oligopéptidos pequeños en el citosol, no se observa toxicidad como la conocida de los oligopéptidos de alto peso molecular, por ejemplo de oligoarginina de alto peso molecular. El "revestimiento" de PEG también permite de alguna manera "revestir" el portador polimérico con un revestimiento hidrófilo en sus extremos terminales, lo cual impide la aglomeración mediada por sal e interacciones no deseadas con los contenidos séricos. En el citosol, este "revestimiento" se elimina fácilmente bajo las condiciones reductoras de la célula. Asimismo, este efecto promueve la liberación de la carga de ácido nucleico en el citosol.

Como se definió arriba, los ligandos (L) pueden usarse opcionalmente en la molécula portadora polimérica de acuerdo con la fórmula genérica (I), por ejemplo para dirigir el polímero portador de la invención y su ácido nucleico complejado a células específicas. Pueden seleccionarse independientemente unos de otros de entre RGD, transferrina, folato, un péptido o secuencia señal, una señal o secuencia de localización, una señal o secuencia de localización nuclear (NLS), un anticuerpo, un péptido de penetración celular (por ejemplo TAT), un ligando de un receptor (por ejemplo citoquinas, hormonas, factores de crecimiento, etc.), moléculas pequeñas (por ejemplo carbohidratos como manosa o galactosa o ligandos sintéticos), agonistas de molécula pequeña, inhibidores o antagonistas de receptores (por ejemplo análogos a peptidomiméticos de RGD), etc. Estos ligandos se pueden unir al componente  $P^1$  y/o  $P^3$  mediante enlaces disulfuro reversibles como los definidos abajo o por cualquier unión química posible, por ejemplo por formación de amida (por ejemplo ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, aminas, etc.), por adición de Michael (por ejemplo partes maleinimida, carbonilos  $\alpha,\beta$  insaturados, etc.), por química simplificada (por ejemplo, azidas o alquinos), por metátesis de alquenos/alquinos (por ejemplo alquenos o alquinos), por formación de imida o hidrozona (aldehídos o cetonas, hidrazinas, hidroxilaminas, aminas), por reacciones de formación de complejos (avidina, biotina, proteína G) o con componentes que permitan reacciones de sustitución tipo  $S_N$  (por ejemplo haloalcanos, tioles, alcoholes, aminas, hidrazinas, hidrazidas, ésteres de ácido sulfónico, sales de oxifosfonio) u otras partes químicas que puedan utilizarse en la unión de componentes adicionales.

En el contexto de la fórmula (I) de la presente invención, los componentes  $P^1$  y  $P^3$  representan una cadena polimérica hidrófila lineal o ramificada que contiene al menos una parte -SH, donde cada  $P^1$  y  $P^3$  se seleccionan independientemente, por ejemplo, de entre polietilenglicol (PEG), poli-*N*-(2-hidroxiipropil)metacrilamida, poli-2-(metacrililoxi)etil-fosforilcolinas, poli(hidroxiálquil-L-asparagina) o poli(hidroxiálquil-L-glutamina).  $P^1$  y  $P^3$  pueden ser idénticos o diferentes. Preferentemente, cada uno de los polímeros hidrófilos  $P^1$  y  $P^3$  tiene un peso molecular de aproximadamente 1 kDa a alrededor de 100 kDa, de preferencia alrededor de 1 kDa a aproximadamente 75 kDa, en especial de alrededor de 5 kDa a aproximadamente 50 kDa, todavía más preferiblemente alrededor de 5 kDa a aproximadamente 25 kDa. Además, cada uno de los polímeros hidrófilos  $P^1$  y  $P^3$  tiene al menos una parte -SH, donde la al menos una parte -SH es capaz de formar un enlace disulfuro por condensación con el componente  $P^2$  o con el componente  $(AA)_x$  si se usa como enlazador entre  $P^1$  y  $P^2$  o  $P^3$  y  $P^2$  como se define más abajo y opcionalmente con un componente adicional, por ejemplo L y/o  $(AA)_x$ , por ejemplo si están presentes dos o más partes -SH. Las siguientes sub-fórmulas " $P^1-S-S-P^2$ " y " $P^2-S-S-P^3$ " de la fórmula genérica (I) anterior (los paréntesis se omiten para mejor lectura), donde cualquiera de S,  $P^1$  y  $P^3$  son como se han definido aquí, representan típicamente una situación donde una parte -SH de los polímeros hidrófilos  $P^1$  y  $P^3$  se ha condensado con una parte -SH del componente  $P^2$  de la fórmula genérica (I) anterior, formando ambos azufres de estas partes -SH un enlace disulfuro -S-S- como se define aquí en la fórmula (I). Estas partes -SH son provistas típicamente por cada uno de los polímeros hidrófilos  $P^1$  y  $P^3$ , por ejemplo vía una cisteína interna o cualquier aminoácido adicional (modificado) o compuesto que porte una parte -SH. En consecuencia, las sub-fórmulas " $P^1-S-S-P^2$ " y " $P^2-S-S-P^3$ " también pueden

escribirse como "P<sup>1</sup>-Cys-Cys-P<sup>2</sup>" y "P<sup>2</sup>-Cys-Cys-P<sup>3</sup>" cuando la parte -SH es provista por una cisteína, representando el término Cys-Cys dos cisteínas unidas por un enlace disulfuro, no vía un enlace peptídico. En este caso, el término "-S-S-" en estas fórmulas también pueden escribirse como "-S-Cys", como "-Cys-S" o como "-Cys-Cys-". En este contexto, el término "-Cys-Cys-" no representa un enlace peptídico, sino un enlace de dos cisteínas vía sus partes -SH para formar un enlace disulfuro. En consecuencia, el término "-Cys-Cys-" también puede entenderse en general como "-(Cys-S)-(S-Cys)-", donde en este caso específico S indica el azufre de la parte -SH de cisteína. Asimismo, los términos "-S-Cys" y "-Cys-S" indican un enlace disulfuro entre una parte que contiene -SH y una cisteína, que también se pueden escribir como "-S-(S-Cys)" y "-(Cys-S)-S". Alternativamente, los polímeros hidrófilos P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup> pueden modificarse con una parte -SH, preferentemente vía una reacción química con un compuesto que porta una parte -SH, de manera que cada uno de los polímeros hidrófilos P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup> porte al menos una de estas partes -SH. Este compuesto que lleva una parte -SH puede ser por ejemplo una cisteína (adicional) o cualquier otro aminoácido (modificado) adicional con una parte -SH. Este compuesto también puede ser cualquier compuesto o parte no amino que contenga o permita introducir una parte -SH en los polímeros hidrófilos P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup> aquí definidos. Tales compuestos no amino pueden unirse a los polímeros hidrófilos P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup> de la fórmula (I) de acuerdo con la presente invención mediante reacciones químicas o vía la unión de compuestos, por ejemplo por la unión de un ácido 3-tiopropiónico o tioimolano, por formación de amida (por ejemplo ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, aminas, etc.), por adición de Michael (por ejemplo partes maleinimida, carbonilos  $\alpha,\beta$  insaturados, etc.), por química simplificada (por ejemplo azidas o alquinos), por metátesis alqueno/alquino (por ejemplo alquenos o alquinos), formación de imina o hidrozona (aldehídos o cetonas, hidrazinas, hidroxilaminas, aminas), reacciones de formación de complejos (avidina, biotina, proteína G) o componentes que permitan reacciones de sustitución tipo S<sub>n</sub> (por ejemplo haloalcanos, tioles, alcoholes, aminas, hidrazinas, hidrazidas, ésteres de ácido sulfónico, sales de oxifosfonio) u otras partes químicas que puedan utilizarse en la unión de componentes adicionales. Un derivado de PEG particularmente preferente en este contexto es alfa-metoxi-omega-mercapto-poli(etilenglicol). En cada caso, la parte SH, por ejemplo de una cisteína o de cualquier aminoácido o compuesto (modificado) adicional, puede estar presente en los extremos terminales o internamente en cualquier posición de los polímeros hidrófilos P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup>. Como se define aquí, cada uno de los polímeros hidrófilos P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup> presenta al menos una parte -SH, preferentemente en un extremo terminal, pero también puede contener dos o incluso más partes -SH, que se pueden usar para unir adicionalmente otros componentes como los aquí definidos, por ejemplo un ligando, un componente aminoácido (AA)<sub>x</sub>, anticuerpos, péptidos de penetración celular (por ejemplo TAT), etc.

De acuerdo otro aspecto preferente de la primera realización de la presente invención, cada uno de los polímeros hidrófilos P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup> puede contener al menos una parte funcional adicional que permite la unión de componentes adicionales como los definidos aquí, por ejemplo un ligando o un componente aminoácido (AA)<sub>x</sub>. Estas partes funcionales pueden seleccionarse de funcionalidades que permitan la fijación de componentes adicionales, por ejemplo funcionalidades como las aquí definidas, por ejemplo por formación de amidas (por ejemplo, ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos o aminas), por adición de Michael (por ejemplo partes maleinimida, carbonilos  $\alpha,\beta$  insaturados), por química simplificada (por ejemplo azidas o alquinos), por metátesis alqueno/alquino (por ejemplo alquenos o alquinos), formación de imina o hidrozona (aldehídos o cetonas, hidrazinas, hidroxilaminas, aminas), reacciones de formación de complejos (avidina, biotina, proteína G) o componentes que permitan reacciones de sustitución tipo S<sub>n</sub> (por ejemplo haloalcanos, tioles, alcoholes, aminas, hidrazinas, hidrazidas, ésteres de ácido sulfónico, sales de oxifosfonio) u otras partes químicas que puedan utilizarse en la unión de componentes adicionales.

El componente P<sup>2</sup> en el contexto de la fórmula (I) de la presente invención representa un péptido o proteína catiónico o policatiónico o alternativamente un polímero catiónico o policatiónico según las reivindicaciones. Cada componente P<sup>2</sup> presenta típicamente al menos dos partes -SH capaces de formar un enlace disulfuro por condensación con otros componentes P<sup>2</sup>, componentes P<sup>1</sup> y/o P<sup>3</sup> o alternativamente con componentes adicionales, por ejemplo componentes aminoácidos (AA)<sub>x</sub>. El componente P<sup>2</sup> está presente típicamente dentro del componente repetitivo [-S-P<sup>2</sup>-S-]<sub>n</sub> de la fórmula (I) de la presente invención. El término "catiónico o policatiónico" se refiere típicamente a una molécula cargada, que está cargada positivamente (catión) a un valor de pH de alrededor de 1 a 9, de preferencia de 4 a 9, 5 a 8 o incluso 6 a 8, en especial a un valor de pH de o por debajo de 9, de o por debajo de 8, de o por debajo de 7, en particular a valores de pH fisiológicos, por ejemplo de alrededor de 7,3 a 7,4. En consecuencia, un péptido o proteína catiónico o policatiónico como componente P<sup>2</sup> o alternativamente un polímero catiónico o policatiónico como componente P<sup>2</sup> de acuerdo con la presente invención está cargado positivamente bajo condiciones fisiológicas, en particular bajo las condiciones salinas fisiológicas de la célula *in vivo*.

En el caso específico de que el componente P<sup>2</sup> de la fórmula (I) de la presente invención sea un péptido o proteína catiónico o policatiónico, las propiedades catiónicas del componente [S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub> o {[S-P<sup>2</sup>-S]<sub>a</sub>/[S-(AA)<sub>x</sub>-S]<sub>b</sub>} (como el definido abajo) pueden determinarse por el contenido de aminoácidos catiónicos en el componente completo [S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub> o {[S-P<sup>2</sup>-S]<sub>a</sub>/[S-(AA)<sub>x</sub>-S]<sub>b</sub>}. Preferiblemente, el contenido en aminoácidos catiónicos del componente [S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub> o {[S-P<sup>2</sup>-S]<sub>a</sub>/[S-(AA)<sub>x</sub>-S]<sub>b</sub>} es de al menos un 10%, 20% o 30%, de preferencia al menos un 40%, muy preferiblemente al menos un 50%, 60% o 70%, pero también preferentemente al menos un 80%, 90% o incluso un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, más preferiblemente al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, o puede estar en el rango de alrededor de 10% a 90%, muy preferiblemente en el rango de alrededor de 15% a 75%, todavía más preferiblemente en el rango de alrededor de 20% a 50%, por ejemplo un 20, 30, 40 ó 50%, o en un rango formado por cualesquiera dos de los valores mencionados arriba, siempre y cuando el contenido de todos los aminoácidos, por ejemplo

catiónicos, lipófilos, hidrófilos, aromáticos y aminoácidos adicionales, en el componente  $[S-P^2-S]_n$  o  $\{[S-P^2-S]_a/[S-(AA)_x-S]_b\}$  sea del 100%.

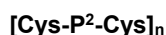
5 En el caso específico de que el componente  $P^2$  de la fórmula (I) de la presente invención sea un polímero catiónico o policatiónico, las propiedades catiónicas del componente  $[S-P^2-S]_n$  o  $\{[S-P^2-S]_a/[S-(AA)_x-S]_b\}$  pueden determinarse por el contenido de cargas catiónicas del componente completo  $[S-P^2-S]_n$  o  $\{[S-P^2-S]_a/[S-(AA)_x-S]_b\}$  en comparación con las cargas totales del componente  $[S-P^2-S]_n$  o  $\{[S-P^2-S]_a/[S-(AA)_x-S]_b\}$ . Preferentemente, el contenido de cargas catiónicas en el componente  $[S-P^2-S]_n$  o  $\{[S-P^2-S]_a/[S-(AA)_x-S]_b\}$  a pH (fisiológico) como el aquí definido es de al menos un 10%, 20% o 30%, de preferencia al menos un 40%, muy preferiblemente al menos un 50%, 60% o 70%, pero también preferentemente de al menos un 80%, 90%, o incluso un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, más preferiblemente al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, o puede estar en el rango de alrededor de 10% a 90%, más preferiblemente en el rango de alrededor de 15% a 75%, todavía más preferiblemente en el rango de alrededor de 10% a 90%, muy preferiblemente en el rango de alrededor de 15% a 75%, todavía más preferiblemente en el rango de alrededor de 20% a 50%, por ejemplo un 20, 30, 40 ó 50%, o en un rango formado por cualesquiera dos de los valores mencionados anteriormente, siempre y cuando el contenido de todas las cargas, por ejemplo cargas positivas y negativas a pH (fisiológico) como el aquí definido del componente  $[S-P^2-S]_n$  o  $\{[S-P^2-S]_a/[S-(AA)_x-S]_b\}$  sea del 100%.

20 En el contexto específico del complejo de carga portador polimérico formado por la carga de ácido nucleico y una molécula portadora polimérica de acuerdo con la fórmula genérica (I)  $L-P^1-S-[S-P^2-S]_n-S-P^3-L$  como se define aquí (o de acuerdo con cualquiera de sus sub-fórmulas aquí), es particularmente preferente que al menos un 10% de todas las cargas del componente repetitivo completo  $[S-P^2-S]_n$  o  $\{[S-P^2-S]_a/[S-(AA)_x-S]_b\}$  sean catiónicas para permitir la formación de complejos de la carga de ácido nucleico cargada negativamente.

El péptido o proteína catiónico o policatiónico como componente  $P^2$  o el polímero catiónico o policatiónico como componente  $P^2$  preferentemente es una molécula lineal; sin embargo, también pueden usarse péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos ramificados como componente  $P^2$  o polímeros catiónicos o policatiónicos ramificados como componente  $P^2$ .

25 Típicamente, el componente  $P^2$ , por ejemplo el péptido o proteína catiónico o policatiónico o el polímero catiónico o policatiónico como se define aquí, se une a sus componentes adyacentes, por ejemplo los componentes  $P^1$  y  $P^3$ , y/o, como parte del componente repetitivo  $[S-P^2-S]_n$ , a componentes  $P^2$  adicionales, vía enlaces disulfuro (-S-S-) o a componentes  $(AA)_x$  como parte de  $\{[S-P^2-S]_a/[S-(AA)_x-S]_b\}$ . En este contexto, los azufres adyacentes al componente  $P^2$  en el componente repetitivo  $[S-P^2-S]_n$  y como los definidos en la fórmula genérica (I)  $L-P^1-S-[S-P^2-S]_n-S-P^3-L$ , necesarios para proporcionar un enlace disulfuro, pueden ser provistos por el propio componente  $P^2$  mediante una parte -SH como la definida aquí o pueden ser provistos modificando el componente  $P^2$  correspondientemente para presentar una parte -SH dentro de la definición anterior del componente repetitivo  $[S-P^2-S]_n$ . Las partes -SH para el componente  $P^2$  son preferentemente como las aquí definidas para los componentes  $P^1$  y  $P^3$ . Si estas partes -SH, necesarias para formar un enlace disulfuro (-S-S-) dentro del significado anterior, son provistas por el propio componente  $P^2$ , esto puede ocurrir por ejemplo mediante al menos dos cisteínas o cualquier otro aminoácido (modificado) o compuestos químicos adicionales que porten una parte -SH y que ya estén dentro de la secuencia de aminoácidos del componente  $P^2$  en cualquier posición de la secuencia de aminoácidos del componente  $P^2$ . Alternativamente, el componente  $P^2$  puede modificarse correspondientemente con un compuesto químico, por ejemplo una cisteína o cualquier aminoácido (modificado) o cualquier compuesto químico adicional que porte una parte -SH (libre). Así, el componente  $P^2$  porta al menos dos partes -SH cuyos átomos de azufre son capaces de formar un enlace disulfuro por condensación con una parte -SH de los componentes  $P^1$  o  $P^3$  como los aquí definidos, o entre un primer componente  $P^2$  y un componente  $P^2$  adicional, etc. Preferentemente, estas partes -SH son como se definen aquí. Preferiblemente, las al menos dos partes SH- se ubican en los extremos terminales o cerca de los extremos terminales del componente  $P^2$ .

45 De acuerdo con un aspecto específico de la primera realización de la presente invención, el componente  $P^2$  dentro del componente repetitivo  $[S-P^2-S]_n$  de la fórmula genérica (I) anterior puede comprender una cisteína como parte -SH. En este contexto, el componente repetitivo  $[S-P^2-S]_n$  puede entonces escribirse como sigue:



50 donde n y  $P^2$  son como se definen aquí y cada Cys proporciona la parte -SH para el enlace disulfuro. Cys es el aminoácido cisteína en su código de tres letras. (Para efectos ilustrativos en la presente descripción el enlace disulfuro -S-Sen general también puede escribirse como -(Cys-S)-(S-Cys)-, donde Cys-S representa una cisteína con una parte -SH de origen natural, formando esta parte -SH un enlace disulfuro con una parte -SH de una segunda cisteína. En consecuencia, el componente repetitivo  $[Cys-P^2-Cys]_n$  también se puede escribir como  $[(S-Cys)-P^2-(Cys-S)]_n$ , lo que indica que la parte -SH es provista por una cisteína y la propia cisteína proporciona el azufre del enlace disulfuro).

En el contexto de la fórmula (I) completa anterior, este aspecto específico de la primera realización puede entonces definirse como sigue:

**L-P<sup>1</sup>-S-[Cys-P<sup>2</sup>-Cys]<sub>n</sub>-S-P<sup>3</sup>-L**

donde L, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>, P<sup>3</sup> y n son como se definen aquí, S es azufre y cada Cys proporciona una parte -SH para el enlace disulfuro.

5 En cada caso, la parte -SH, por ejemplo de una cisteína o de cualquier aminoácido (modificado) adicional o compuesto adicional usado para modificar el componente P<sup>2</sup>, puede estar presente en el péptido o proteína catiónico o policatiónico o en el polímero catiónico o policatiónico como componente P<sup>2</sup>, internamente o en uno o ambos de sus extremos terminales; por ejemplo, si un péptido o proteína catiónico o policatiónico se usa como componente P<sup>2</sup> en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal, en ambos de estos extremos terminales, y/o internamente en cualquier posición del péptido o proteína catiónico o policatiónico como componente P<sup>2</sup>. Preferentemente, la parte -SH puede estar presente en el componente P<sup>2</sup> al menos en un extremo terminal, en especial en ambos extremos terminales, por ejemplo en el extremo N-terminal y/o en el extremo C-terminal, en particular tanto en el extremo N-terminal como en el extremo C-terminal, de un péptido o proteína catiónico o policatiónico como componente P<sup>2</sup>.

10 Debido a su carácter repetitivo, el componente [S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub> puede representar una situación donde una de las al menos dos partes -SH del componente P<sup>2</sup> se condensa con una parte -SH de un componente P<sup>2</sup> adicional de la fórmula genérica (I) anterior, formando ambos azufres de estas partes -SH un enlace disulfuro (-S-S-) entre un primer componente P<sup>2</sup> y al menos un componente P<sup>2</sup> adicional.

15 En este contexto, el número de repeticiones del componente P<sup>2</sup> en la fórmula (I) de acuerdo con la presente invención se define por el entero n. n es un entero, seleccionado típicamente de un intervalo de alrededor de 1 a 50, de preferencia de un intervalo de alrededor de 1, 2 ó 3 a 30, muy preferiblemente de un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4 ó 5 a 25, o un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4 ó 5 a 20, o un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4 ó 5 a 15, o un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4 ó 5 a 10, incluyendo por ejemplo un intervalo de alrededor de 3 a 20, 4 a 20, 5 a 20 ó 10 a 20, o un intervalo de alrededor de 3 a 15, 4 a 15, 5 a 15, o 10 a 15, o un intervalo de alrededor de 6 a 11 ó 7 a 10. Si, por ejemplo, en el componente repetitivo [S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub> el entero n es 5, el componente repetitivo [S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub> se lee de preferencia como sigue:

**[S-P<sup>2</sup>-S-S-P<sup>2</sup>-S-S-P<sup>2</sup>-S-S-P<sup>2</sup>-S-S-P<sup>2</sup>-S]**

20 En el ejemplo anterior, el componente P<sup>2</sup> ocurre 5 veces (de preferencia en un orden lineal), donde cada componente P<sup>2</sup> está enlazado con su componente adyacente por un enlace disulfuro dentro de la definición anterior del componente repetitivo [S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub>. Cualquiera de los componentes P<sup>2</sup> puede ser igual o diferente entre sí.

25 De acuerdo con un aspecto particular de esta realización, el componente P<sup>2</sup> representa un péptido o proteína catiónico o policatiónico que tiene una longitud de aproximadamente 3 a alrededor de 100 aminoácidos, muy preferiblemente de una longitud de alrededor de 3 a aproximadamente 50 aminoácidos, todavía más preferiblemente de una longitud de alrededor de 3 a aproximadamente 25 aminoácidos, por ejemplo una longitud de aproximadamente 3 a 10, 5 a 15, 10 a 20 ó 15 a 25 aminoácidos, más preferiblemente de alrededor de 5 a aproximadamente 20 y todavía más preferiblemente una longitud de alrededor de 10 a aproximadamente 20.

30 El péptido o proteína catiónico o policatiónico como componente P<sup>2</sup> puede ser cualquier proteína o péptido adecuado para este propósito y que tenga al menos dos partes -SH, particularmente cualquier péptido o proteína catiónico o policatiónico capaz de formar un complejo con un ácido nucleico, y así preferentemente condensar el ácido nucleico.

35 Los péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos particularmente preferentes como componente P<sup>2</sup> que tienen al menos dos partes -SH pueden seleccionarse de entre protamina, nucleolina, espermina o espermidina, poli-L-lisina (PLL); polipéptidos básicos, poli-arginina, péptidos penetradores celulares (CPP), CPP quiméricos, tales como Transportano, o péptidos MPG, péptidos de unión a VIH, Tat, VIH-1 Tat (VIH), péptidos derivados de Tat, oligoargininas, miembros de la familia de la penetratina, por ejemplo penetratina, péptidos derivados de antenapedia, en particular péptidos derivados de antenapedia de *Drosophila antennapedia*, pAntp, plsl, CPP derivados antimicrobianos, buforina-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP, MAP, KALA, PpTG20, péptidos ricos en prolina, L-oligómeros, péptidos ricos en arginina, FGF, lactoferrina, histonas, péptidos derivados de VP22 o análogos, HSV, VP22 (herpes simple), MAP, KALA o dominios de transducción de proteínas (PTD), PpT620, péptidos ricos en prolina, péptidos ricos en lisina, Pep-1, L-oligómeros, péptidos de calcitonina, etc.

40 De acuerdo con un aspecto preferente particular de la primera realización de la presente invención, péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos como componente P<sup>2</sup> se seleccionan de entre los siguientes péptidos catiónicos que tienen la siguiente suma total de fórmula (II), bajo la condición de que tengan además al menos dos partes -SH:

45 **{(Arg)<sub>i</sub>;(Lys)<sub>m</sub>;(His)<sub>n</sub>;(Orn)<sub>o</sub>;(Xaa)<sub>x</sub>}; (fórmula II)**



## ES 2 719 598 T3

5 donde  $l + m + n + o + x = 8-15$ , y  $l, m, n$  u o independientemente unos de otros puede ser cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15, siempre y cuando el contenido total de Arg, Lys, His y Orn represente al menos un 10% de todos los aminoácidos del oligopéptido; y Xaa puede ser cualquier aminoácido seleccionado de entre aminoácidos nativos (es decir de origen natural) o no nativos, excepto Arg, Lys, His u Orn; y  $x$  puede ser cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14, siempre y cuando el contenido total de Xaa no exceda el 90% de todos los aminoácidos del oligopéptido. Cualquiera de los aminoácidos Arg, Lys, His, Orn y Xaa puede ser situado en cualquier lugar del péptido. Péptidos de esta fórmula particularmente preferentes son oligoargininas tales como, por ejemplo, Arg<sub>7</sub>, Arg<sub>8</sub>, Arg<sub>9</sub>, H<sub>3</sub>R<sub>9</sub>, R<sub>9</sub>H<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>R<sub>9</sub>H<sub>3</sub>, YSSR<sub>9</sub>SSY, (RKH)<sub>4</sub>, Y(RKH)<sub>2</sub>R, etc. (SEQ ID NO: 1-9).

10 De acuerdo con un aspecto preferente particular de la primera realización, los péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos como componente P<sup>2</sup> que tienen la fórmula empírica (II) mostrada arriba y que tienen además al menos dos partes -SH pueden seleccionarse del siguiente subgrupo de fórmulas:

15 Arg<sub>8</sub>, Arg<sub>9</sub>, Arg<sub>10</sub>, Arg<sub>11</sub>, Arg<sub>12</sub>, Arg<sub>13</sub>, Arg<sub>14</sub>, Arg<sub>15</sub>; (SEQ ID NO: 2-3, 10-15);  
 Lys<sub>8</sub>, Lys<sub>9</sub>, Lys<sub>10</sub>, Lys<sub>11</sub>, Lys<sub>12</sub>, Lys<sub>13</sub>, Lys<sub>14</sub>, Lys<sub>15</sub>; (SEQ ID NO: 16-23);  
 His<sub>8</sub>, His<sub>9</sub>, His<sub>10</sub>, His<sub>11</sub>, His<sub>12</sub>, His<sub>13</sub>, His<sub>14</sub>, His<sub>15</sub>; (SEQ ID NO: 24-31);  
 Orn<sub>8</sub>, Orn<sub>9</sub>, Orn<sub>10</sub>, Orn<sub>11</sub>, Orn<sub>12</sub>, Orn<sub>13</sub>, Orn<sub>14</sub>, Orn<sub>15</sub>; (SEQ ID NO: 32-39).

20 De acuerdo con un aspecto particularmente preferente adicional de la primera realización, los péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos como componente P<sup>2</sup> que tienen la fórmula empírica (II) mostrada arriba y que tienen además al menos dos partes -SH pueden seleccionarse de, sin estar limitados a, el siguiente subgrupo de sub-fórmulas, donde las siguientes fórmulas (al igual que la fórmula empírica (II)) no especifican ningún orden de aminoácidos, sino que están diseñadas para reflejar fórmulas empíricas mostrando exclusivamente el (número de) aminoácidos como componentes del péptido respectivo. Así, como ejemplo, la fórmula empírica Arg<sub>(7-14)</sub>Lys<sub>1</sub> significa que los péptidos que tienen esta fórmula contienen 7 a 14 residuos de Arg y 1 residuo de Lys en cualquier orden. Si los péptidos contienen 7 residuos Arg y 1 residuo Lys, todas las variantes que tengan 7 residuos Arg y 1 residuo Lys están incluidas. El residuo Lys puede entonces estar situado en cualquier sitio en por ejemplo la secuencia de 8 aminoácidos de longitud compuesta de 7  
 25 residuos Arg y 1 Lys. El subgrupo preferentemente comprende:

Arg<sub>(7-14)</sub>Lys<sub>1</sub>, Arg<sub>(7-14)</sub>His<sub>1</sub>, Arg<sub>(7-14)</sub>Orn<sub>1</sub>, Lys<sub>(7-14)</sub>His<sub>1</sub>, Lys<sub>(7-14)</sub>Orn<sub>1</sub>, His<sub>(7-14)</sub>Orn<sub>1</sub>;

Arg<sub>(6-13)</sub>Lys<sub>2</sub>, Arg<sub>(6-13)</sub>His<sub>2</sub>, Arg<sub>(6-13)</sub>Orn<sub>2</sub>, Lys<sub>(6-13)</sub>His<sub>2</sub>, Lys<sub>(6-13)</sub>Orn<sub>2</sub>, His<sub>(6-13)</sub>Orn<sub>2</sub>;

Arg<sub>(5-12)</sub>Lys<sub>3</sub>, Arg<sub>(5-12)</sub>His<sub>3</sub>, Arg<sub>(5-12)</sub>Orn<sub>3</sub>, Lys<sub>(5-12)</sub>His<sub>3</sub>, Lys<sub>(5-12)</sub>Orn<sub>3</sub>, His<sub>(5-12)</sub>Orn<sub>3</sub>;

Arg<sub>(4-11)</sub>Lys<sub>4</sub>, Arg<sub>(4-11)</sub>His<sub>4</sub>, Arg<sub>(4-11)</sub>Orn<sub>4</sub>, Lys<sub>(4-11)</sub>His<sub>4</sub>, Lys<sub>(4-11)</sub>Orn<sub>4</sub>, His<sub>(4-11)</sub>Orn<sub>4</sub>;

Arg<sub>(3-10)</sub>Lys<sub>5</sub>, Arg<sub>(3-10)</sub>His<sub>5</sub>, Arg<sub>(3-10)</sub>Orn<sub>5</sub>, Lys<sub>(3-10)</sub>His<sub>5</sub>, Lys<sub>(3-10)</sub>Orn<sub>5</sub>, His<sub>(3-10)</sub>Orn<sub>5</sub>;

Arg<sub>(2-9)</sub>Lys<sub>6</sub>, Arg<sub>(2-9)</sub>His<sub>6</sub>, Arg<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>6</sub>, Lys<sub>(2-9)</sub>His<sub>6</sub>, Lys<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>6</sub>, His<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>6</sub>;

Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>7</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>His<sub>7</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>7</sub>, Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>7</sub>, Lys<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>7</sub>, His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>7</sub>;

Arg<sub>(6-13)</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>1</sub>, Arg<sub>(6-13)</sub>Lys<sub>1</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(6-13)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(6-13)</sub>His<sub>1</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(6-13)</sub>Orn<sub>1</sub>, Lys<sub>(6-13)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>1</sub>,  
 Arg<sub>1</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>(6-13)</sub>, Arg<sub>1</sub>His<sub>(6-13)</sub>Orn<sub>1</sub>, Lys<sub>1</sub>His<sub>(6-13)</sub>Orn<sub>1</sub>;

Arg<sub>(5-12)</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>1</sub>, Arg<sub>(5-12)</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>2</sub>, Arg<sub>(5-12)</sub>Lys<sub>2</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(5-12)</sub>Lys<sub>1</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>(5-12)</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(5-12)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>2</sub>,  
 Arg<sub>2</sub>Lys<sub>(5-12)</sub>His<sub>1</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(5-12)</sub>His<sub>2</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>(5-12)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(5-12)</sub>Orn<sub>2</sub>, Lys<sub>(5-12)</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>1</sub>, Lys<sub>(5-12)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>2</sub>,  
 Arg<sub>2</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>(5-12)</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>(5-12)</sub>, Arg<sub>2</sub>His<sub>(5-12)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>1</sub>His<sub>(5-12)</sub>Orn<sub>2</sub>, Lys<sub>2</sub>His<sub>(5-12)</sub>Orn<sub>1</sub>, Lys<sub>1</sub>His<sub>(5-12)</sub>Orn<sub>2</sub>;

Arg<sub>(4-11)</sub>Lys<sub>3</sub>His<sub>1</sub>, Arg<sub>(4-11)</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>, Arg<sub>(4-11)</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>3</sub>, Arg<sub>(4-11)</sub>Lys<sub>3</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(4-11)</sub>Lys<sub>2</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>(4-11)</sub>Lys<sub>1</sub>Orn<sub>3</sub>,  
 Arg<sub>(4-11)</sub>His<sub>3</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(4-11)</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>(4-11)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>3</sub>Lys<sub>(4-11)</sub>His<sub>1</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>(4-11)</sub>His<sub>2</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(4-11)</sub>His<sub>3</sub>,  
 Arg<sub>3</sub>Lys<sub>(4-11)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>(4-11)</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(4-11)</sub>Orn<sub>3</sub>, Lys<sub>(4-11)</sub>His<sub>3</sub>Orn<sub>1</sub>, Lys<sub>(4-11)</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>2</sub>, Lys<sub>(4-11)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>3</sub>,  
 Arg<sub>3</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>(4-11)</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>(4-11)</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>3</sub>His<sub>(4-11)</sub>, Arg<sub>3</sub>His<sub>(4-11)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>2</sub>His<sub>(4-11)</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>1</sub>His<sub>(4-11)</sub>Orn<sub>3</sub>,  
 Lys<sub>3</sub>His<sub>(4-11)</sub>Orn<sub>1</sub>, Lys<sub>2</sub>His<sub>(4-11)</sub>Orn<sub>2</sub>, Lys<sub>1</sub>His<sub>(4-11)</sub>Orn<sub>3</sub>;

Arg<sub>(3-10)</sub>Lys<sub>4</sub>His<sub>1</sub>, Arg<sub>(3-10)</sub>Lys<sub>3</sub>His<sub>2</sub>, Arg<sub>(1-10)</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>3</sub>, Arg<sub>(3-10)</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>4</sub>, Arg<sub>(3-10)</sub>Lys<sub>4</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(3-10)</sub>Lys<sub>3</sub>Orn<sub>2</sub>,  
 Arg<sub>(3-10)</sub>Lys<sub>2</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>(3-10)</sub>Lys<sub>1</sub>Orn<sub>4</sub>, Arg<sub>(3-10)</sub>His<sub>4</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(3-10)</sub>His<sub>3</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>(3-10)</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>(3-10)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>4</sub>,  
 Arg<sub>4</sub>Lys<sub>(3-10)</sub>His<sub>1</sub>, Arg<sub>3</sub>Lys<sub>(3-10)</sub>His<sub>2</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>(3-10)</sub>His<sub>3</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(3-10)</sub>His<sub>4</sub>, Arg<sub>4</sub>Lys<sub>(3-10)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>3</sub>Lys<sub>(3-10)</sub>Orn<sub>2</sub>,  
 Arg<sub>2</sub>Lys<sub>(3-10)</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(3-10)</sub>Orn<sub>4</sub>, Lys<sub>(3-10)</sub>His<sub>4</sub>Orn<sub>1</sub>, Lys<sub>(3-10)</sub>His<sub>3</sub>Orn<sub>2</sub>, Lys<sub>(3-10)</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>3</sub>, Lys<sub>(3-10)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>4</sub>,  
 Arg<sub>4</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>(3-10)</sub>, Arg<sub>3</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>(3-10)</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>3</sub>His<sub>(3-10)</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>4</sub>His<sub>(3-10)</sub>, Arg<sub>4</sub>His<sub>(3-10)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>3</sub>His<sub>(3-10)</sub>Orn<sub>2</sub>,  
 Arg<sub>2</sub>His<sub>(3-10)</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>1</sub>His<sub>(3-10)</sub>Orn<sub>4</sub>, Lys<sub>4</sub>His<sub>(3-10)</sub>Orn<sub>1</sub>, Lys<sub>3</sub>His<sub>(3-10)</sub>Orn<sub>2</sub>, Lys<sub>2</sub>His<sub>(3-10)</sub>Orn<sub>3</sub>, Lys<sub>1</sub>His<sub>(3-10)</sub>Orn<sub>4</sub>;

Arg<sub>(2-9)</sub>Lys<sub>5</sub>His<sub>1</sub>, Arg<sub>(2-9)</sub>Lys<sub>4</sub>His<sub>2</sub>, Arg<sub>(2-9)</sub>Lys<sub>3</sub>His<sub>3</sub>, Arg<sub>(2-9)</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>4</sub>, Arg<sub>(2-9)</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>5</sub>, Arg<sub>(2-9)</sub>Lys<sub>5</sub>Orn<sub>1</sub>,  
 Arg<sub>(2-9)</sub>Lys<sub>4</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>(2-9)</sub>Lys<sub>3</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>(2-9)</sub>Lys<sub>2</sub>Orn<sub>4</sub>, Arg<sub>(2-9)</sub>Lys<sub>1</sub>Orn<sub>5</sub>, Arg<sub>(2-9)</sub>His<sub>5</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(2-9)</sub>His<sub>4</sub>Orn<sub>2</sub>,  
 Arg<sub>(2-9)</sub>His<sub>3</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>(2-9)</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>4</sub>, Arg<sub>(2-9)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>5</sub>, Arg<sub>5</sub>Lys<sub>(2-9)</sub>His<sub>1</sub>, Arg<sub>4</sub>Lys<sub>(2-9)</sub>His<sub>2</sub>, Arg<sub>3</sub>Lys<sub>(2-9)</sub>His<sub>3</sub>,  
 Arg<sub>2</sub>Lys<sub>(2-9)</sub>His<sub>4</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(2-9)</sub>His<sub>5</sub>, Arg<sub>5</sub>Lys<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>4</sub>Lys<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>3</sub>Lys<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>4</sub>,  
 Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>5</sub>, Lys<sub>(2-9)</sub>His<sub>5</sub>Orn<sub>1</sub>, Lys<sub>(2-9)</sub>His<sub>4</sub>Orn<sub>2</sub>, Lys<sub>(2-9)</sub>His<sub>3</sub>Orn<sub>3</sub>, Lys<sub>(2-9)</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>4</sub>, Lys<sub>(2-9)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>5</sub>,  
 Arg<sub>5</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>(2-9)</sub>, Arg<sub>4</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>(2-9)</sub>, Arg<sub>3</sub>Lys<sub>3</sub>His<sub>(2-9)</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>4</sub>His<sub>(2-9)</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>5</sub>His<sub>(2-9)</sub>, Arg<sub>5</sub>His<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>1</sub>,  
 Arg<sub>4</sub>His<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>3</sub>His<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>2</sub>His<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>4</sub>, Arg<sub>1</sub>His<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>5</sub>, Lys<sub>5</sub>His<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>1</sub>, Lys<sub>4</sub>His<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>2</sub>,  
 Lys<sub>3</sub>His<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>3</sub>, Lys<sub>2</sub>His<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>4</sub>, Lys<sub>1</sub>His<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>5</sub>;

Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>6</sub>His<sub>1</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>5</sub>His<sub>2</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>4</sub>His<sub>3</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>3</sub>His<sub>4</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>5</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>6</sub>,  
 Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>6</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>5</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>4</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>3</sub>Orn<sub>4</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>2</sub>Orn<sub>5</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>1</sub>Orn<sub>6</sub>,  
 Arg<sub>(1-8)</sub>His<sub>6</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>His<sub>5</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>His<sub>4</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>His<sub>3</sub>Orn<sub>4</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>5</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>6</sub>,  
 Arg<sub>6</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>2</sub>, Arg<sub>4</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>3</sub>, Arg<sub>3</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>4</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>5</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>6</sub>,  
 Arg<sub>6</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>4</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>3</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>4</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>5</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>6</sub>,  
 Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>6</sub>Orn<sub>1</sub>, Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>5</sub>Orn<sub>2</sub>, Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>4</sub>Orn<sub>3</sub>, Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>3</sub>Orn<sub>4</sub>, Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>5</sub>, Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>6</sub>,  
 Arg<sub>6</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>(1-8)</sub>, Arg<sub>5</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>(1-8)</sub>, Arg<sub>4</sub>Lys<sub>3</sub>His<sub>(1-8)</sub>, Arg<sub>3</sub>Lys<sub>4</sub>His<sub>(1-8)</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>5</sub>His<sub>(1-8)</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>6</sub>His<sub>(1-8)</sub>,  
 Arg<sub>6</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>5</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>4</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>3</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>4</sub>, Arg<sub>2</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>5</sub>, Arg<sub>1</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>6</sub>,  
 Lys<sub>6</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>1</sub>, Lys<sub>5</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>2</sub>, Lys<sub>4</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>3</sub>, Lys<sub>3</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>4</sub>, Lys<sub>2</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>5</sub>, Lys<sub>1</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>6</sub>;

Arg<sub>(5-12)</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(5-12)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>(5-12)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>(5-12)</sub>;

Arg<sub>(4-11)</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(4-11)</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(4-11)</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>(4-11)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(4-11)</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>1</sub>,  
 Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(4-11)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>(4-11)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>(4-11)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>(4-11)</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>(4-11)</sub>,  
 Arg<sub>1</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>(4-11)</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>(4-11)</sub>;

Arg<sub>(3-10)</sub>Lys<sub>3</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(3-10)</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(3-10)</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>(3-10)</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>(3-10)</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>3</sub>,  
 Arg<sub>3</sub>Lys<sub>(3-10)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>(3-10)</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>(3-10)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(3-10)</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(3-10)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>3</sub>,  
 Arg<sub>3</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>(3-10)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>(3-10)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>(3-10)</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>(3-10)</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>(3-10)</sub>Orn<sub>3</sub>,  
 Arg<sub>3</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>(3-10)</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>(3-10)</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>(3-10)</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>(3-10)</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>3</sub>Orn<sub>(3-10)</sub>;

Arg<sub>(2-9)</sub>Lys<sub>4</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(2-9)</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>4</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(2-9)</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>4</sub>, Arg<sub>(2-9)</sub>Lys<sub>3</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(2-9)</sub>Lys<sub>3</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>2</sub>,  
 Arg<sub>(2-9)</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>3</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(2-9)</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>(2-9)</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>(2-9)</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>3</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>(2-9)</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>2</sub>,  
 Arg<sub>4</sub>Lys<sub>(2-9)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(2-9)</sub>His<sub>4</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(2-9)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>4</sub>, Arg<sub>3</sub>Lys<sub>(2-9)</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>3</sub>Lys<sub>(2-9)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>2</sub>,  
 Arg<sub>2</sub>Lys<sub>(2-9)</sub>His<sub>3</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>(2-9)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(2-9)</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(2-9)</sub>His<sub>3</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>(2-9)</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>2</sub>,  
 Arg<sub>4</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>4</sub>His<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>4</sub>, Arg<sub>3</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>3</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>2</sub>,  
 Arg<sub>2</sub>Lys<sub>3</sub>His<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>3</sub>His<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>(2-9)</sub>Orn<sub>2</sub>,

Arg<sub>4</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>(2-9)</sub>, Arg<sub>1</sub>LYS<sub>4</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>(2-9)</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>4</sub>Orn<sub>(2-9)</sub>, Arg<sub>3</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>(2-9)</sub>, Arg<sub>3</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>(2-9)</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>3</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>(2-9)</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>3</sub>Orn<sub>(2-9)</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>3</sub>Orn<sub>(2-9)</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>3</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>(2-9)</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>(2-9)</sub>;

Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>5</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>5</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>5</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>4</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>4</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>4</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>4</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>4</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>4</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>3</sub>His<sub>3</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>3</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>(1-8)</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>3</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>5</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>5</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>5</sub>, Arg<sub>4</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>4</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>4</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>4</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>4</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>4</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>3</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>3</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>3</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>(1-8)</sub>His<sub>3</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>5</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>5</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>5</sub>, Arg<sub>4</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>4</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>4</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>4</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>4</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>4</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>2</sub>, Arg<sub>3</sub>Lys<sub>3</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>1</sub>, Arg<sub>3</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>3</sub>His<sub>(1-8)</sub>Orn<sub>3</sub>, Arg<sub>5</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>(1-8)</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>5</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>(1-8)</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>5</sub>Orn<sub>(1-8)</sub>, Arg<sub>4</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>(1-8)</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>4</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>(1-8)</sub>, Arg<sub>2</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>4</sub>Orn<sub>(1-8)</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>2</sub>His<sub>4</sub>Orn<sub>(1-8)</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>4</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>(1-8)</sub>, Arg<sub>4</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>2</sub>Orn<sub>(1-8)</sub>, Arg<sub>3</sub>Lys<sub>3</sub>His<sub>1</sub>Orn<sub>(1-8)</sub>, Arg<sub>3</sub>Lys<sub>1</sub>His<sub>3</sub>Orn<sub>(1-8)</sub>, Arg<sub>1</sub>Lys<sub>3</sub>His<sub>3</sub>Orn<sub>(1-8)</sub>;

De acuerdo con otro aspecto particularmente preferente de la primera realización, los péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos como componente P<sup>2</sup> que tienen la fórmula empírica (II) mostrada anteriormente y que tienen además al menos dos partes -SH pueden seleccionarse de entre las siguientes fórmulas: Arg<sub>8</sub>, Arg<sub>9</sub>, Arg<sub>10</sub>, Arg<sub>11</sub>, Arg<sub>12</sub>, Arg<sub>13</sub>, Arg<sub>14</sub>, Arg<sub>15</sub>; Lys<sub>8</sub>, Lys<sub>9</sub>, Lys<sub>10</sub>, Lys<sub>11</sub>, Lys<sub>12</sub>, Lys<sub>13</sub>, Lys<sub>14</sub>, Lys<sub>15</sub>; His<sub>8</sub>, His<sub>9</sub>, His<sub>10</sub>, His<sub>11</sub>, His<sub>12</sub>, His<sub>13</sub>, His<sub>14</sub>, His<sub>15</sub>; Orn<sub>8</sub>, Orn<sub>9</sub>, Orn<sub>10</sub>, Orn<sub>11</sub>, Orn<sub>12</sub>, Orn<sub>13</sub>, Orn<sub>14</sub>, Orn<sub>15</sub>; (SEQ ID NO: 2-3, 10-39, véase arriba).

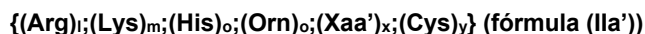
De acuerdo con un aspecto particularmente preferente adicional de la primera realización, los péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos como componente P<sup>2</sup> que tienen la fórmula empírica (II) mostrada arriba y que tienen además al menos dos partes -SH pueden seleccionarse del subgrupo consistente en las fórmulas genéricas Arg<sub>9</sub> (también llamada R<sub>9</sub>), Arg<sub>9</sub>His<sub>3</sub> (también llamada R<sub>9</sub>H<sub>3</sub>), His<sub>3</sub>Arg<sub>9</sub>His<sub>3</sub> (también llamada H<sub>3</sub>R<sub>9</sub>H<sub>3</sub>), TyrSerSerArg<sub>9</sub>SerSerTyr (también llamada YSSR<sub>9</sub>SSY), His<sub>3</sub>Arg<sub>9</sub>SerSerTyr (también llamada H<sub>3</sub>R<sub>9</sub>SSY), (ArgLysHis)<sub>4</sub> (también llamada (RKH)<sub>4</sub>), Tyr(ArgLysHis)<sub>2</sub>Arg (también llamada Y(RKH)<sub>2</sub>R); (SEQ ID NO: 2, 5-9, 40, véase arriba).

De acuerdo con un aspecto particularmente preferente adicional de la primera realización, el péptido o proteína catiónico o policatiónico como componente P<sup>2</sup>, cuando se define de acuerdo con la fórmula {(Arg)<sub>i</sub>;(Lys)<sub>m</sub>;(His)<sub>n</sub>;(Orn)<sub>o</sub>;(Xaa)<sub>x</sub>} (fórmula (II)) mostrada arriba y que tiene además al menos dos partes -SH puede seleccionarse de la fórmula (IIa), de preferencia con la condición de que al menos una parte -SH sea provista por un residuo cisteína:



donde (Arg)<sub>i</sub>;(Lys)<sub>m</sub>;(His)<sub>n</sub>;(Orn)<sub>o</sub>; y x son como se han definido aquí.

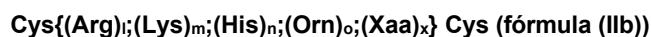
Alternativamente, el péptido o proteína catiónico o policatiónico como componente P<sup>2</sup> cuando se define de acuerdo con la fórmula {(Arg)<sub>i</sub>;(Lys)<sub>m</sub>;(His)<sub>n</sub>;(Orn)<sub>o</sub>;(Xaa)<sub>x</sub>} (fórmula (II)) mostrada arriba y que tiene además al menos dos partes -SH puede seleccionarse de la fórmula (IIa'), de preferencia con la condición de que al menos una parte -SH sea provista por un residuo cisteína:



donde (Arg)<sub>i</sub>;(Lys)<sub>m</sub>;(His)<sub>n</sub>;(Orn)<sub>o</sub>; y x son como se han definido aquí, Xaa' es cualquier aminoácido seleccionado de aminoácidos nativos (es decir, de origen natural) o no nativos excepto Arg, Lys, His, Orn o Cys e y es cualquier número seleccionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80 y 81-90, siempre y cuando el contenido total de Arg (Arginina), Lys (Lisina), His (Histidina) y Orn (Ornitina) represente al menos el 10% de todos los aminoácidos del oligopéptido.

Estos aspectos de la primera realización de la presente invención se pueden aplicar a situaciones en las que el componente P<sup>2</sup> se seleccione de un péptido o proteína catiónico o policatiónico de acuerdo con la fórmula empírica (Arg)<sub>i</sub>;(Lys)<sub>m</sub>;(His)<sub>n</sub>;(Orn)<sub>o</sub>;(Xaa)<sub>x</sub> (fórmula (II)) mostrada arriba, que comprenda o haya sido modificado con al menos una cisteína como parte -SH en el significado anterior, de manera que el péptido catiónico o policatiónico como componente P<sup>2</sup> porta al menos una cisteína que es capaz de formar un enlace disulfuro con otros componentes de la fórmula (I).

De acuerdo con otro aspecto preferente particular de la primera realización, el péptido o proteína catiónico o policatiónico como componente P<sup>2</sup>, cuando se define de acuerdo con la fórmula {(Arg)<sub>i</sub>;(Lys)<sub>m</sub>;(His)<sub>n</sub>;(Orn)<sub>o</sub>;(Xaa)<sub>x</sub>} (fórmula (II)) como la mostrada arriba, y preferentemente que tiene además al menos dos partes -SH puede seleccionarse de, sin limitarse a, la fórmula (IIb), preferentemente con la condición de que las al menos dos partes -SH sean provistas por dos residuos de cisteína terminales.



Cys(Arg<sub>8</sub>)Cys, Cys(Arg<sub>9</sub>)Cys, Cys(Arg<sub>10</sub>)Cys, Cys(Arg<sub>11</sub>)Cys, Cys(Arg<sub>12</sub>)Cys, Cys(Arg<sub>13</sub>)Cys, Cys(Arg<sub>14</sub>)Cys, Cys(Arg<sub>15</sub>)Cys; Cys(Lys<sub>8</sub>)Cys, Cys(Lys<sub>9</sub>)Cys, Cys(Lys<sub>10</sub>)Cys, Cys(Lys<sub>11</sub>)Cys, Cys(Lys<sub>12</sub>)Cys, Cys(Lys<sub>13</sub>)Cys, Cys(Lys<sub>14</sub>)Cys, Cys(Lys<sub>15</sub>)Cys; Cys(His<sub>8</sub>)Cys, Cys(His<sub>9</sub>)Cys, Cys(His<sub>10</sub>)Cys, Cys(His<sub>11</sub>)Cys, Cys(His<sub>12</sub>)Cys, Cys(His<sub>13</sub>)Cys, Cys(His<sub>14</sub>)Cys, Cys(His<sub>15</sub>)Cys; Cys(Orn<sub>8</sub>)Cys, Cys(Orn<sub>9</sub>)Cys, Cys(Orn<sub>10</sub>)Cys, Cys(Orn<sub>11</sub>)Cys, Cys(Orn<sub>12</sub>)Cys, Cys(Orn<sub>13</sub>)Cys, Cys(Orn<sub>14</sub>)Cys, Cys(Orn<sub>15</sub>)Cys, (SEQ ID NOs: 41 to 72)

CysArg <sub>9</sub> Cys:	Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys-Cys
CysArg <sub>9</sub> His <sub>3</sub> Cys:	Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-H is-H i s-H is-Cys
CysHis <sub>3</sub> Arg <sub>9</sub> His <sub>3</sub> Cys:	Cys-His-His-His-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-His-His-His-Cys
CysTyrSerSerArg <sub>9</sub> SerSerTyrCys:	Cys-Tyr-Ser-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Ser-Tyr-Cys
CysHis <sub>3</sub> Arg <sub>9</sub> SerSerTyrCys:	Cys-H is-H i s-H i s-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Ser-Tyr-Cys
Cys (ArgLysHis) <sub>4</sub> Cys:	Cys-Arg-Lys-His-Arg-Lys-His-Arg-Lys-H is-Arg-Lys-H i s-Cys
CysTyr(ArgLysHis) <sub>2</sub> ArgCys:	Cys-Tyr-Arg-Lys-His-Arg-Lys-His-Arg-Cys
CysHis <sub>3</sub> Arg <sub>9</sub> His <sub>3</sub> Cys:	Cys-His-His-His-Arg-Arg-Arg-Arg-His-His-His-Cys
CysHis <sub>6</sub> Arg <sub>9</sub> His <sub>6</sub> Cys:	Cys-His-His-His-H is-His-His-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-His-His-His-His-His-Cys
CysHis <sub>3</sub> Arg <sub>4</sub> His <sub>3</sub> Cys:	Cys-H is-His-His-Arg-Arg-Arg-His-His-His-Cys
CysHis <sub>6</sub> Arg <sub>4</sub> His <sub>6</sub> Cys	Cys-His-His-His-His-H is-His-Arg-Arg-Arg-His-His-H is-H is-His-His-Cys
CysArg <sub>12</sub> Cys:	Cys-Arg- Arg-Arg-Arg-Arg Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg -Cys

El componente P<sup>2</sup> de la fórmula (I) de la presente invención preferentemente está presente como componente repetitivo [-S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub>. Este componente repetitivo [-S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub> puede prepararse utilizando al menos uno o incluso más del mismo o de los diferentes componentes P<sup>2</sup> definidos arriba y polimerizando éstos en una reacción de condensación de polimerización vía las partes -SH.

- 5 De acuerdo con un aspecto específico de la primera realización, este componente repetitivo [-S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub> puede prepararse usando al menos uno o incluso más del mismo o de diferentes péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos definidos arriba, y polimerizándolos en una reacción de condensación de polimerización vía sus partes -SH. En consecuencia, este componente repetitivo [-S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub> contiene un número de al menos una o incluso más de las mismas o diferentes proteínas o péptidos catiónicos o policatiónicos definidos arriba determinados por el entero n.
- 10 De acuerdo con otro aspecto específico de la primera realización, este componente repetitivo [-S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub> puede prepararse usando al menos uno o incluso más del mismo o diferentes polímeros catiónicos o policatiónicos de los definidos arriba y polimerizándolos en una reacción de condensación de polimerización vía sus partes -SH. En consecuencia, este componente repetitivo [-S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub> contiene un número de al menos uno o incluso más de uno del mismo o de los diferentes polímeros catiónicos o policatiónicos definidos arriba determinados por el entero n.
- 15 De acuerdo con otro aspecto específico de la primera realización, este componente repetitivo [-S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub> puede prepararse usando al menos uno o incluso más del mismo o de diferentes polímeros catiónicos o policatiónicos como los definidos arriba y al menos uno o más del mismo o de diferentes proteínas o péptidos catiónicos o policatiónicos de los definidos arriba, y polimerizando éstos en una reacción de condensación de polimerización vía sus partes -SH. En consecuencia, este componente repetitivo [-S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub> contiene un número de al menos uno o incluso más del mismo o de diferentes polímeros catiónicos o policatiónicos de los definidos arriba y al menos una o incluso más de la misma o de diferentes proteínas o péptidos catiónicos o policatiónicos de los definidos arriba, ambos determinados conjuntamente por el entero n.
- 20

- De acuerdo con un aspecto más de la primera realización, el portador polimérico de acuerdo con la fórmula (I) anterior puede comprender al menos un componente aminoácido (AA)<sub>x</sub> según las reivindicaciones, siendo AA, de preferencia, un aminoácido tal como los definidos a continuación, el cual, cuando está presente como componente aminoácido (AA)<sub>x</sub>, permite (esencialmente) modificar las propiedades biofísicas/bioquímicas del portador polimérico de acuerdo con la fórmula (I) como se define aquí. De acuerdo con la presente invención, el número de aminoácidos en este componente aminoácido (AA)<sub>x</sub> (repeticiones) está definido por x. En el contexto anterior, x es preferentemente un entero y puede seleccionarse de un intervalo de 1 a 100, preferentemente de un intervalo de 1 a 50, en especial de 1 a 30, y con especial preferencia seleccionado de un número comprendido entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15-30, por ejemplo de un intervalo de 1 a 30, de un intervalo de 1 a 15, o de un número comprendido entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15, o puede seleccionarse de un rango formado por dos cualesquiera de los valores mencionados.
- 25
- 30

Tales componentes (AA)<sub>x</sub> pueden estar contenidos en cualesquiera partes vehículo polimérico según la fórmula (I) anterior y, por tanto, puede estar unido a todos los componentes del portador polimérico según la fórmula (I). Es particularmente preferente que (AA)<sub>x</sub> esté presente como ligando o como parte del componente repetitivo [-S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub>.

- 35 En este contexto, es particularmente preferente que el componente aminoácido (AA)<sub>x</sub> contenga o esté flanqueado (por ejemplo terminalmente) por al menos una parte que contenga -SH, que permita introducir este componente (AA)<sub>x</sub> vía un enlace disulfuro en el portador polimérico de acuerdo con la fórmula (I) como se define aquí. En este contexto, el componente aminoácido (AA)<sub>x</sub> también puede leerse como un componente -S-(AA)<sub>x</sub>- o -S-(AA)<sub>x</sub>-S-, donde S representa una parte que contiene -SH (o, por supuesto, un azufre de un enlace disulfuro), por ejemplo un residuo de cisteína. En el caso específico de que la parte que contiene -SH sea una cisteína, el componente aminoácido (AA)<sub>x</sub> puede también leerse como Cys-(AA)<sub>x</sub>- o -Cys-(AA)<sub>x</sub>-Cys-, donde Cys representa cisteína y proporciona la necesaria parte -SH para un enlace disulfuro (así, -Cys-(AA)<sub>x</sub>-Cys- también puede escribirse como -(S-Cys)-(AA)<sub>x</sub>-(Cys-S)- y -Cys-(AA)<sub>x</sub>- también puede escribirse como -(S-Cys)-(AA)<sub>x</sub>-). La parte que contiene -SH también puede introducirse en el componente aminoácido (AA)<sub>x</sub> usando cualquier modificación o reacción como las mostradas arriba para los componentes P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup> o P<sup>3</sup>.
- 40
- 45 En el caso específico de que el componente aminoácido (AA)<sub>x</sub> esté unido a dos componentes del portador polimérico de la invención de acuerdo con la fórmula (I), es preferente que (AA)<sub>x</sub> contenga al menos dos partes -SH, por ejemplo al menos dos cisteínas, preferentemente en sus extremos terminales. Esto es particularmente preferente si (AA)<sub>x</sub> es parte del componente repetitivo [-S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub>.

- 50 En una alternativa el componente aminoácido (AA)<sub>x</sub> se introduce en el portador polimérico inventivo de acuerdo con la fórmula (I) como se define aquí por cualquier reacción de adición química posible. Por tanto, el componente aminoácido (AA)<sub>x</sub> contiene al menos una parte funcional adicional que permite su unión a otro componente como se define aquí, por ejemplo el componente P<sup>1</sup> o P<sup>3</sup>, P<sup>2</sup>, L, u otro componente aminoácido adicional (AA)<sub>x</sub>, etc. Estas partes funcionales pueden seleccionarse de entre funcionalidades que permitan la unión de componentes adicionales, por ejemplo funcionalidades como las definidas aquí, por ejemplo por formación de amida (por ejemplo ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, aminas, etc.), por adición de Michael (por ejemplo partes maleinimida, carbonilos α,β insaturados, etc.), por química simplificada (por ejemplo azidas o alquinos), por metátesis de alquenos/alquinos (por ejemplo alquenos o alquinos), formación de imina o hidrozona (aldehídos o cetonas, hidrazinas, hidroxilaminas, aminas), reacciones de formación de complejos
- 55

(avidina, biotina, proteína G) o componentes que permitan reacciones de sustitución tipo  $S_n$  (por ejemplo haloalcanos, tioles, alcoholes, aminas, hidrazinas, hidrazidas, ésteres de ácido sulfónico, sales de oxifosfonio) u otras partes químicas que puedan utilizarse en la unión de componentes adicionales.

5 El componente aminoácido (AA) $_x$  también puede estar presente como un componente aminoácido repetitivo mixto [(AA) $_x$ ] $_z$  donde el número de componentes aminoácidos (AA) $_x$  está definido además por  $z$ . En este contexto,  $z$  es un entero y puede seleccionarse de un rango de alrededor de 1 a 30, de preferencia de un intervalo de 1 a 15, en especial de 1 a 10 ó de 1 a 5 y con especial preferencia se selecciona de un número entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15, o puede seleccionarse de un intervalo formado por cualesquiera dos de los valores citados. Este componente aminoácido repetitivo mixto [(AA) $_x$ ] $_z$  se puede usar para integrar varios de los mismos o diferentes componentes aminoácidos (AA) $_x$  como los aquí definidos en el portador polimérico. Preferentemente, en el componente aminoácido repetitivo mixto [(AA) $_x$ ] $_z$ , el componente aminoácido (AA) $_x$  puede contener o puede estar flanqueado (por ejemplo, terminalmente) por al menos una parte que contenga -SH, preferentemente al menos dos partes que contengan -SH como ya se ha definido anteriormente, que permiten el acoplamiento de los diferentes componentes aminoácidos (AA) $_x$  usando un enlace disulfuro vía una polimerización de condensación. Al igual que anteriormente, el componente aminoácido repetitivo mixto [(AA) $_x$ ] $_z$  también puede leerse como [S(AA) $_x$ -S] $_z$ , donde S representa una parte que contiene -SH, por ejemplo un residuo cisteína. En el caso específico de que la parte que contiene -SH sea una cisteína, el componente aminoácido repetitivo mixto [(AA) $_x$ ] $_z$  también puede leerse como [Cys-(AA) $_x$ -Cys] $_z$ , siendo Cys cisteína, y proporciona la parte -SH necesaria para un enlace disulfuro. La parte que contiene -SH también se puede introducir en el componente aminoácido (AA) $_x$  usando cualquier modificación o reacción como las mostradas arriba para los componentes  $P^1$ ,  $P^2$  o  $P^3$ .

20 El componente aminoácido (AA) $_x$  o el componente aminoácido repetitivo mixto [(AA) $_x$ ] $_z$ , pueden proporcionarse con al menos una parte -SH, por ejemplo en una forma representada por la fórmula (AA) $_x$ -SH. Entonces, el componente (AA) $_x$  según la fórmula (AA) $_x$ -SH o el componente aminoácido repetitivo mixto [(AA) $_x$ ] $_z$  según la fórmula [(AA) $_x$ ] $_z$ -SH pueden unirse a cualquiera de los componentes L,  $P^1$ ,  $P^2$  y/o  $P^3$  o a otro componente (AA) $_x$  mediante un enlace disulfuro. Si se une al componente  $P^1$  y/o al componente  $P^3$ , los componentes  $P^1$  y/o  $P^3$  preferentemente tienen al menos dos partes -SH para permitir un enlace adicional de los componentes  $P^1$  y/o  $P^3$  a un componente  $P^2$  mediante una parte -SH formando un enlace disulfuro (véase arriba). El componente aminoácido (AA) $_x$  en una forma representada por la fórmula (AA) $_x$ -SH o el componente aminoácido repetitivo mixto [(AA) $_x$ ] $_z$  de acuerdo con la fórmula [(AA) $_x$ ] $_z$ -SH también se pueden usar para terminar una reacción de condensación debido a su única parte -SH. En este caso, el componente aminoácido (AA) $_x$  en una forma representada por la fórmula (AA) $_x$ -SH se acopla preferentemente terminal a los componentes  $P^1$  y/o  $P^3$ . El componente aminoácido (AA) $_x$  en una forma representada por la fórmula (AA) $_x$ -SH o el componente aminoácido repetitivo mixto [(AA) $_x$ ] $_z$  de acuerdo con la fórmula [(AA) $_x$ ] $_z$ -SH puede usarse también para unirse internamente a cualquiera de los componentes L,  $P^1$ ,  $P^2$  y/o  $P^3$  o a un componente (AA) $_x$  adicional vía una parte -SH interna adicional de cualquiera de los componentes L,  $P^1$ ,  $P^2$  y/o  $P^3$  o (AA) $_x$ .

35 Además, el componente aminoácido (AA) $_x$  puede proporcionarse con dos partes -SH (o incluso más), por ejemplo en una forma representada por la fórmula HS-(AA) $_x$ -SH. Además, el componente aminoácido repetitivo mixto [(AA) $_x$ ] $_z$  puede ser provisto con dos partes -SH (o incluso más), por ejemplo en una forma representada por la fórmula HS-[(AA) $_x$ ] $_z$ -SH, para permitir la unión a dos funcionalidades mediante enlaces disulfuro, por ejemplo si el componente aminoácido (AA) $_x$  o el componente aminoácido repetitivo mixto [(AA) $_x$ ] $_z$  se usa como enlazador entre otros dos componentes (por ejemplo como un enlazador entre los componentes L y  $P^1$ , entre los componentes  $P^1$  y  $P^2$ , en o como parte del componente repetitivo [S- $P^2$ -S] $_n$ , entre los componentes  $P^2$  y  $P^3$  y/o entre los componentes  $P^3$  y L). En este caso, una parte -SH preferentemente está protegida en una primera etapa usando un grupo protector conocido en la técnica, llevando a un componente aminoácido (AA) $_x$  de fórmula HS-(AA) $_x$ -S-grupo protector o a un componente aminoácido repetitivo mixto [(AA) $_x$ ] $_z$  de fórmula HS-[(AA) $_x$ ] $_z$ -S-grupo protector. Luego, el componente aminoácido (AA) $_x$  o el componente aminoácido repetitivo mixto [(AA) $_x$ ] $_z$  puede unirse a un componente L,  $P^1$ ,  $P^2$  y/o  $P^3$  para formar un primer enlace disulfuro vía la parte -SH no protegida. La parte -SH protegida entonces típicamente se desprotege y se une a otra parte -SH libre adicional de otro componente L,  $P^1$ ,  $P^2$  y/o  $P^3$  adicional para formar un segundo enlace disulfuro. En caso de que el componente aminoácido (AA) $_x$  o el componente aminoácido repetitivo mixto [(AA) $_x$ ] $_z$  sea parte del componente repetitivo [S- $P^2$ -S] $_n$ , se prefiere que la formación de los enlaces disulfuro entre (AA) $_x$  y  $P^2$  ocurra concurrentemente con la reacción de policondensación del componente repetitivo [S- $P^2$ -S] $_n$  y, por tanto, no es necesaria la protección de las al menos dos partes -SH terminales.

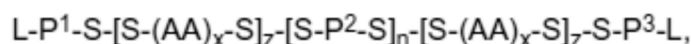
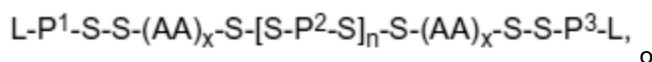
50 Alternativamente, el componente aminoácido (AA) $_x$  o el componente aminoácido repetitivo mixto [(AA) $_x$ ] $_z$ , pueden ser provistos con otras funcionalidades como ya se describió arriba para los componentes  $P^1$  y  $P^2$  y/o  $P^3$ , que permitan la unión del componente aminoácido (AA) $_x$  o la unión del componente aminoácido repetitivo mixto [(AA) $_x$ ] $_z$  a cualquiera de los componentes  $P^1$ ,  $P^2$  y/o  $P^3$  o (AA) $_x$  y opcionalmente al componente L.

55 Así, de acuerdo con la presente invención, el componente aminoácido (AA) $_x$  y/o el componente aminoácido repetitivo mixto [(AA) $_x$ ] $_z$  pueden unirse a  $P^1$ ,  $P^2$ ,  $P^3$ , (AA) $_x$  y/o L con o sin el uso de un enlace disulfuro. La unión sin emplear un enlace disulfuro puede lograrse por cualquiera de las reacciones descritas arriba, de preferencia uniendo el componente aminoácido (AA) $_x$  o el componente aminoácido repetitivo mixto [(AA) $_x$ ] $_z$  a  $P^1$ ,  $P^2$ ,  $P^3$ , (AA) $_x$  y/o L usando una química de amida como la aquí definida. Si se desea o es necesario, el otro extremo del componente aminoácido (AA) $_x$  o del

5 componente aminoácido repetitivo mixto [(AA)x]<sub>z</sub>, por ejemplo el extremo N o C, se puede usar para acoplar otro componente, por ejemplo un ligando L. Para este propósito, el otro extremo del componente aminoácido (AA)x o del componente aminoácido repetitivo mixto [(AA)x]<sub>z</sub> preferentemente comprende o está modificado para comprender una funcionalidad adicional, por ejemplo una especie alquino (véase arriba), que se puede usar para añadir el otro componente por medio de, por ejemplo, química simplificada. Este constructo, por ejemplo L-(AA)x-P<sup>1</sup>-S- o L-[(AA)x]<sub>z</sub>-P<sup>1</sup>-S-, se puede usar para terminar la reacción de condensación de polimerización del componente repetitivo [S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub>. Si el ligando se une mediante un enlace ácido lábil, el enlace puede ser cortado en el endosoma y el portador polimérico inventivo presenta el componente aminoácido (AA)x o el componente aminoácido repetitivo mixto [(AA)x]<sub>z</sub> en su superficie.

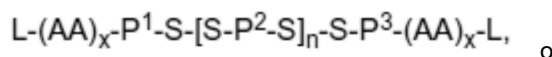
10 El componente aminoácido (AA)x o el componente aminoácido repetitivo mixto [(AA)x]<sub>z</sub> pueden estar presentes como un componente adicional de la fórmula genérica (I) anterior, por ejemplo como un enlazador entre los componentes P<sup>1</sup> o P<sup>3</sup> y P<sup>2</sup>, o como un ligante entre los componentes L y P<sup>1</sup> o P<sup>2</sup> o como un componente adicional del componente repetitivo [S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub>.

15 De acuerdo con una primera alternativa, este componente aminoácido (AA)x o el componente aminoácido repetitivo mixto [(AA)x]<sub>z</sub> pueden estar presentes como un enlazador entre los componentes P<sup>1</sup> o P<sup>3</sup> y el componente P<sup>2</sup>. Preferentemente, esto se representa en el contexto del portador polimérico inventivo completo de acuerdo con la fórmula (I) por las siguientes fórmulas:

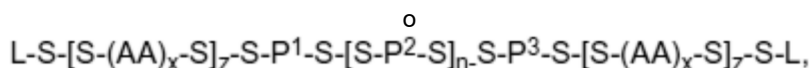
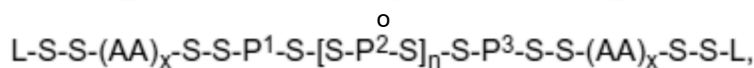
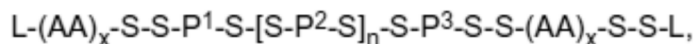


20 donde n, x, z, S, L, AA, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup> y P<sup>3</sup> son preferentemente como se han definido aquí. En las fórmulas anteriores, el término "-S-S-" representa un enlace disulfuro como ya se ha definido, donde este al menos un azufre del enlace disulfuro también puede ser proporcionado por una cisteína. En este caso, el término "-S-S-" en estas fórmulas también puede escribirse como "-S-Cys", como "-Cys-S" o como "-Cys-Cys-". En este contexto, el término "-Cys-Cys-" no representa un enlace peptídico sino un enlace de dos cisteínas a través de sus partes -SH para formar un enlace disulfuro. Por consiguiente, el término "-Cys-Cys-" también puede entenderse en general como "-(Cys-S)-(S-Cys)-", donde en este caso específico S indica el azufre del resto -SH de la cisteína. Del mismo modo, los términos "-S-Cys" y "-Cys-S" indican un enlace disulfuro entre un parte que contiene -SH y una cisteína, que también puede escribirse como "-S-(S-Cys)" y "-(CysS)-S".

30 De acuerdo con una segunda alternativa, este componente aminoácido (AA)x o el componente aminoácido repetitivo mixto [(AA)x]<sub>z</sub> pueden estar presentes como parte de los componentes P<sup>1</sup> o P<sup>3</sup> y el componente L. Esto se representa preferentemente en el contexto del portador polimérico inventivo completo de acuerdo con la fórmula (I) por las siguientes fórmulas:

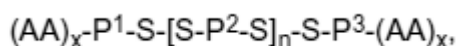


o alternativamente

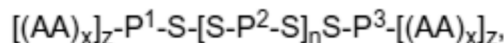


40 etc., donde n, x, z, S, AA, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup> y P<sup>3</sup> son preferentemente como se han definido aquí. En las fórmulas anteriores, el término "-S-S-" representa un enlace disulfuro, como ya se definió arriba.

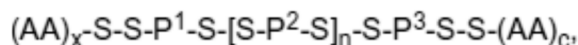
45 De acuerdo con una tercera alternativa, el componente aminoácido (AA)x o el componente aminoácido repetitivo mixto [(AA)x]<sub>z</sub> pueden estar presentes como parte de los componentes P<sup>1</sup> y/o P<sup>3</sup>, donde el componente aminoácido (AA)x puede unirse directamente (por ejemplo, al terminus de) del componente P<sup>1</sup> y/o P<sup>3</sup> sin un ligando adicional L. En este caso, el componente (AA)x puede estar en forma de un ligando como se definió anteriormente. Esto se representa preferiblemente en el contexto de todo del portador polimérico en su conjunto de acuerdo con la fórmula (I) mediante las siguientes fórmulas:



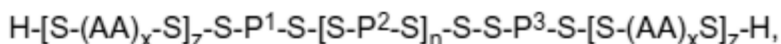
o



o alternativamente

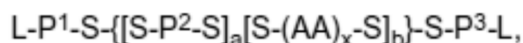


o



donde n, x, z, S, AA, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup> y P<sup>3</sup> son preferiblemente como se definen aquí. En las fórmulas anteriores, el término "-S-S-" representa un enlace disulfuro, como ya se definió anteriormente. La parte -SH libre en los extremos terminales en la última fórmula también puede terminarse usando un compuesto monotiol como se define aquí.

De acuerdo con una cuarta alternativa particularmente preferida, el componente aminoácido (AA)<sub>x</sub>, preferiblemente escrito como S-(AA) xS o [S-AA)x-S] se puede usar para modificar el componente P<sup>2</sup>, particularmente el contenido del componente S-P<sup>2</sup>-S en el componente repetitivo [S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub> de la fórmula (I) anterior. Esto se puede representar en el contexto del portador polimérico completo de acuerdo con la fórmula (I), por ejemplo, por la siguiente fórmula (Ia):



donde x, S, L, AA, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup> y P<sup>3</sup> son preferentemente como se definen aquí. En la fórmula (Ia) anterior, cualquiera de los componentes individuales [S-P<sup>2</sup>-S] y [S-(AA)x-S] puede estar presente en cualquier orden en la sub-fórmula {[S-P<sup>2</sup>-S]<sub>a</sub>[S-(AA)x-S]<sub>b</sub>}. Los números de los componentes individuales [S-P<sup>2</sup>-S] y [S-(AA)x-S] en la sub-fórmula {[S-P<sup>2</sup>-S]<sub>a</sub>[S-(AA)x-S]<sub>b</sub>} son determinados por enteros a y b donde a + b = n. n es un entero y se define como anteriormente para la fórmula (I).

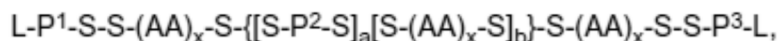
a es un entero típicamente seleccionado independientemente del entero b de un intervalo de 1 a 50, de preferencia de un intervalo de 1, 2 ó 3 a 30, en especial de un intervalo de 1, 2, 3, 4 ó 5 a 25, o un intervalo de 1, 2, 3, 4 ó 5 a 20, o un intervalo de 1, 2, 3, 4 ó 5 a 15, o un intervalo de 1, 2, 3, 4 ó 5 a 10, incluyendo por ejemplo un intervalo de 3 a 20, 4 a 20, 5 a 20 ó 10 a 20, o un intervalo de 3 a 15, 4 a 15, 5 a 15 ó 10 a 15, o un intervalo de 6 a 11 ó 7 a 10. En particular, a está en un intervalo de 1, 2, 3, 4 ó 5 a 10, muy preferiblemente en un intervalo de 1, 2, 3 ó 4 a 9, en un intervalo de 1, 2, 3 ó 4 a 8, o en un intervalo de 1, 2 ó 3 a 7.

b es un entero típicamente seleccionado independientemente del entero a de un intervalo de 1 a 50, de preferencia de un intervalo de 1, 2 ó 3 a 30, en especial de un intervalo de 1, 2, 3, 4 ó 5 a 25, o un intervalo de 1, 2, 3, 4 ó 5 a 20, o un intervalo de 1, 2, 3, 4 ó 5 a 15, o un intervalo de 1, 2, 3, 4 ó 5 a 10, incluyendo por ejemplo un intervalo de 3 a 20, 4 a 20, 5 a 20 ó 10 a 20, o un intervalo de 3 a 15, 4 a 15, 5 a 15 ó 10 a 15, o un intervalo de 6 a 11 ó 7 a 10. En particular, b está en un intervalo de 1, 2, 3, 4 ó 5 a 10, muy preferiblemente en un intervalo de 1, 2, 3 ó 4 a 9, en un intervalo de 1, 2, 3 ó 4 a 8, o un intervalo de 1, 2 ó 3 a 7.

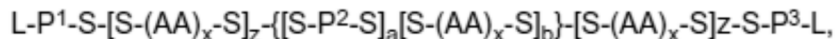
En la fórmula anterior, el término "-S-S-" (los corchetes se omiten para mejor lectura) representa un enlace disulfuro como ya se ha definido.

La modificación del componente P<sup>2</sup>, particularmente del componente S-P<sup>2</sup>-S del componente repetitivo [S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub>, al "diluir" el mismo con los componentes aminoácido (AA)<sub>x</sub>, también se puede lograr en el contexto de cualquiera de las alternativas mencionadas arriba del portador polimérico completo de acuerdo con la fórmula (I),

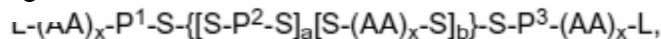




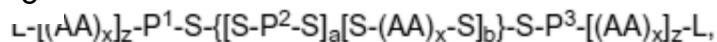
o



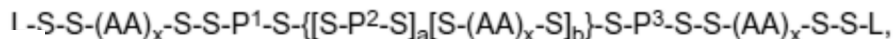
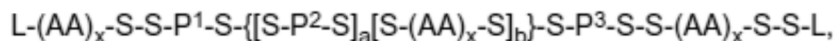
o



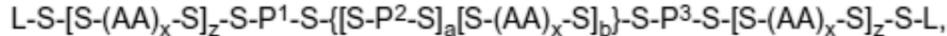
o



o



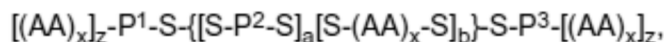
o



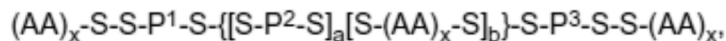
o



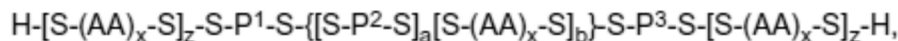
o



o



o



donde n, x, z, a, b, S, L, AA, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup> y P<sup>3</sup> son como se han definido aquí. Asimismo, el término “-S-S-” representa un enlace disulfuro como se define aquí.

- 5 En las alternativas anteriores, cuando el componente [S-P<sup>2</sup>-S] está de preferencia “diluido” con los componentes aminoácido [S-(AA)<sub>x</sub>-S], la relación está determinada por los enteros a y b, siendo a + b = n. Preferentemente, los enteros a y b se seleccionan de manera que las propiedades de unión catiónicas del componente [S-P<sup>2</sup>-S] no se pierdan, sino que continúan hasta un grado mínimo en la sub-fórmula/componente {[S-P<sup>2</sup>-S]<sub>a</sub>[S-(AA)<sub>x</sub>-S]<sub>b</sub>}. Esto permite debilitar (“diluir”) la fuerza de unión catiónica del componente [S-P<sup>2</sup>-S] en el componente repetitivo [S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub> del portador polimérico de la invención de la fórmula (I) hasta un grado deseado.
- 10

En este contexto específico la fuerza de unión catiónica (deseada) de la sub-fórmula/componente {[S-P<sup>2</sup>-S]<sub>a</sub>[S-(AA)x-S]<sub>b</sub>} puede determinarse usando diferentes métodos.

5 De acuerdo con una primera alternativa, el componte P<sup>2</sup> de la fórmula (I) de la presente invención particularmente preferente es un péptido catiónico o policationico como el aquí definido. Además, el componente aminoácido (AA)x, escrito de preferencia como [S-(AA)x-S], representa típicamente una secuencia peptídica. En este caso específico, las propiedades catiónicas de la sub-fórmula/componente {[S-P<sup>2</sup>-S]<sub>a</sub>[S-(AA)x-S]<sub>b</sub>} pueden determinarse según su contenido de aminoácidos catiónicos en la sub-fórmula/componente completa. De preferencia, el contenido de aminoácidos catiónicos en la sub-fórmula/componente {[S-P<sup>2</sup>-S]<sub>a</sub>[S-(AA)x-S]<sub>b</sub>} es de al menos un 10%, 20% o 30%, de preferencia al menos 40%, muy preferiblemente al menos 50%, 60% o 70%, pero también de preferencia al menos 80%, 90% o incluso 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99% o 100%, o puede estar en el intervalo de alrededor de 10% a 90%, muy preferiblemente en el intervalo de alrededor de 15% a 75%, todavía más preferiblemente en el intervalo de alrededor de 20% a 50%, por ejemplo 20, 30, 40 ó 50%, o en un intervalo formado por cualesquiera dos de los valores mencionados arriba, siempre y cuando el contenido de todos los aminoácidos, por ejemplo aminoácidos catiónicos, lipófilos, hidrófilos, aromáticos y adicionales, en la sub-fórmula/componente {[S-P<sup>2</sup>-S]<sub>a</sub>[S-(AA)x-S]<sub>b</sub>} completo sea del 100%.

15 De acuerdo con una segunda alternativa, el componente P<sup>2</sup> de la fórmula (I) de la presente invención particularmente preferente es un polímero catiónico o policationico tal como se define aquí. El componente aminoácido (AA)x, de preferencia escrito como [S-(AA)x-S], representa típicamente una secuencia peptídica. En este caso específico, las propiedades catiónicas de la sub-fórmula/componente {[S-P<sup>2</sup>-S]<sub>a</sub>[S-(AA)x-S]<sub>b</sub>} pueden determinarse según su contenido de cargas catiónicas en la sub-fórmula/componente completo. De preferencia, el contenido de cargas catiónicas en la sub-fórmula/componente {[S-P<sup>2</sup>-S]<sub>a</sub>[S-(AA)x-S]<sub>b</sub>} a pH (fisiológico) como el aquí definido es de al menos un 10%, 20% o 30%, de preferencia al menos 40%, muy preferiblemente al menos 50%, 60% o 70%, pero también de preferencia al menos 80%, 90% o incluso 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, más preferiblemente al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, o puede estar en el intervalo de alrededor de 10% a 90%, muy preferiblemente en el intervalo de alrededor de 15% a 75%, incluso preferiblemente en el intervalo de alrededor de 20% a 50%, por ejemplo 20, 30, 40 ó 50%, o en un intervalo formado por cualesquiera dos de los valores mencionados arriba, siempre y cuando el contenido de todas las cargas, por ejemplo cargas positivas y negativas a pH (fisiológico) como el aquí definido, en la sub-fórmula/componente {[S-P<sup>2</sup>-S]<sub>a</sub>[S-(AA)x-S]<sub>b</sub>} completo sea el 100%.

Además, el portador polimérico de acuerdo con la fórmula (I) arriba (o de acuerdo con cualquiera de sus sub-fórmulas aquí) puede comprender como un componente adicional, de preferencia como un ligando L o como un componente aminoácido (AA)x, un péptido señal, una señal o secuencia de localización o una señal o secuencia de localización nuclear (NLS), que permite una translocalización del portador polimérico inventivo de acuerdo con la fórmula (I) anterior a un objetivo específico, por ejemplo la célula, el núcleo, el compartimiento endosómico, secuencias para la matriz mitocondrial, secuencias de localización para la membrana plasmática, secuencias de localización para el aparato de Golgi, el núcleo, el citoplasma y el citoesqueleto, etc. Este péptido de señal, señal o secuencia de localización o señal de localización nuclear puede usarse para el transporte de cualquiera de cualquiera de los ácidos nucleicos aquí definidos, de preferencia un ARN o un ADN, muy preferiblemente un ARNsh o un ADNp, por ejemplo al núcleo. Sin limitarse a ello, este péptido de señal, señal o secuencia de localización o señal de localización nuclear puede comprender, por ejemplo, secuencias de localización para el retículo endoplásmico. Señales o secuencias de localización o señales de localización nuclear particulares pueden incluir, por ejemplo, KDEL (SEQ ID NO: 85), DDEL (SEQ ID NO: 86), DEEL (SEQ ID NO: 87), QEDL (SEQ ID NO: 88), RDEL (SEQ ID NO: 89) y GQNLSTSN (SEQ ID NO: 90), secuencias de localización nuclear, incluyendo PKKKRKV (SEQ ID NO: 91), PQKKIKS (SEQ ID NO: 92), QPKKP (SEQ ID NO: 93), RKKR (SEQ ID NO: 94), RKKRRQRRRAHQ (SEQ ID NO: 95), RQARRRRRRWRERQR (SEQ ID NO: 96), MPLTRRRPAASQALAPPTP (SEQ ID NO: 97), GAALTILV (SEQ ID NO: 98) y GAALTLLG (SEQ ID NO: 99), secuencias de localización para el compartimiento endosómico, incluyendo MDDQRDLISNNEQLP (SEQ ID NO: 100), secuencias de localización para la matriz mitocondrial, incluyendo MLFNLRXXLNNAAFRHGHNFMRNFRGQPLX (SEQ ID NO: 101), secuencias de localización para la membrana plasmática: GVCSSNP (SEQ ID NO: 102), GQTVTTPL (SEQ ID NO: 103), GQELSQHE (SEQ ID NO: 104), GNPSYNP (SEQ ID NO: 105), GVSGSKGQ (SEQ ID NO: 106), GQTITTP (SEQ ID NO: 107), GQTLTTPL (SEQ ID NO: 108), GQIFRSA (SEQ ID NO: 109), GQIHGLSP (SEQ ID NO: 110), GARASVLS (SEQ ID No: 111) y GCTLSAEE (SEQ ID No: 112), secuencias de localización para el retículo endoplásmico y el núcleo, incluyendo GAQVSSQK (SEQ ID NO: 113) y GAQLSRNT (SEQ ID NO: 114), secuencias de localización para el aparato de Golgi, el núcleo, el citoplasma y el citoesqueleto, incluyendo GNAAAKK (SEQ ID NO: 115), secuencias de localización para el citoplasma y citoesqueleto, incluyendo GNEASYPL (SEQ ID NO: 116), secuencias de localización para la membrana plasmática y citoesqueleto, incluyendo GSSKSKPK (SEQ ID NO: 117), etc. Ejemplos de secuencias de péptidos de señal secretoras como las aquí definidas incluyen, sin limitarse a, secuencias de señal de moléculas MHC clásicas o no clásicas (por ejemplo secuencias de señal de moléculas MHC I y II, por ejemplo, de la molécula MHC clase I HLA-A\*0201), secuencias señal de citoquinas o inmunoglobulinas como las aquí definidas, secuencias señal de la cadena invariante de inmunoglobulinas o anticuerpos como las aquí definidas, secuencias señal de Lamp1, Tapasin, Erp57, calreticulina, calnexina, y proteínas asociadas a membrana adicionales, o de proteínas asociadas con el retículo endoplásmico (ER) o el compartimiento endosómico-lisosómico. De manera particularmente preferible, se pueden usar secuencias de señal de la molécula MHC clase I HLA-A\*0201. Muy preferiblemente, este componente adicional puede presentarse como el componente L como aquí definido. Alternativamente, este componente adicional también puede estar unido, por ejemplo, a un componente L, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>, P<sup>3</sup> o

(AA)<sub>x</sub>, como el aquí definido, por ejemplo a una cadena lateral de cualquiera de los componentes L, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>, P<sup>3</sup> o (AA)<sub>x</sub>, de preferencia por medio de una cadena lateral del componente P<sup>2</sup>, u opcionalmente como un enlazador entre los componentes L y P<sup>1</sup> o P<sup>3</sup> y L. La unión a cualquiera de los componentes L, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup> o P<sup>3</sup> también se puede lograr usando un enlace ácido lábil, de preferencia por medio de una cadena lateral de cualquiera de los componentes L, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>, P<sup>3</sup>, que permita desprender o liberar al componente adicional a valores de pH más bajos, por ejemplo a valores de pH fisiológicos como se define aquí.

Además, el portador polimérico de acuerdo con la fórmula (I) anterior (o de acuerdo con cualquiera de sus sub-fórmulas aquí) puede comprender péptidos o proteínas funcionales adicionales, de preferencia como ligandos o componentes aminoácido (AA)<sub>x</sub>, que pueden modular la funcionalidad del portador polimérico en consecuencia. De acuerdo con una alternativa, estos péptidos o proteínas funcionales adicionales pueden comprender los llamados péptidos de penetración celular (CPPs) o péptidos catiónicos para el transporte.

Se prefieren particularmente CPP, que inducen un cambio de conformación mediado por pH en el endosoma y llevan a una liberación mejorada del portador polimérico inventivo (en complejo con un ácido nucleico) a partir del endosoma por inserción en la capa lípida del liposoma. Estos llamados péptidos de penetración celular (CPP) o péptidos catiónicos para transporte, pueden incluir, sin estar limitados a éstos, protamina, nucleolina, espermina o espermidina, poli-L-lisina (PLL), polipéptidos básicos, poli-arginina, péptidos de penetración celular (CPP), CPP quiméricos, tales como Transportano o péptidos MPG, péptidos de unión a VIH, Tat, HIV-1 Tat (HIV), péptidos derivados de Tat, oligoargininas, miembros de la familia penetratina, por ejemplo penetratina, péptidos derivados de antenapedia (particularmente de *Drosophila antennapedia*), pAntp, plsl, etc., CPP derivados antimicrobianos, por ejemplo buforina-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP, MAP, KALA, PpTG20, péptidos ricos en prolina, L-oligómeros, péptidos ricos en arginina, péptidos de calcitonina, FGF, lactoferrina, poli-L-lisina, poli-arginina, histonas, péptidos derivados o análogos de VP22, HSV, VP22 (herpes simple), MAP, KALA o dominios de transducción de proteínas (PTDs), PpT620, péptidos ricos en prolina, péptidos ricos en arginina, péptidos ricos en lisina, Pep-1, L-oligómeros, péptidos de calcitonina. Asimismo, este componente adicional puede ocurrir como componente L o (AA)<sub>x</sub> como se define aquí. Alternativamente, este componente adicional puede unirse también a un componente L, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>, P<sup>3</sup> o (AA)<sub>x</sub> como el aquí definido, por ejemplo a una cadena lateral de cualquiera de los componentes L, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>, P<sup>3</sup> o (AA)<sub>x</sub>, de preferencia por medio de una cadena lateral del componente P<sup>2</sup>, u opcionalmente como un enlazador entre los componentes L y P<sup>1</sup> o P<sup>3</sup> y L. La unión a cualquiera de los componentes L, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>, P<sup>3</sup> o (AA)<sub>x</sub> también se puede lograr usando un enlace ácido lábil, de preferencia por medio de una cadena lateral de cualquiera de los componentes L, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>, P<sup>3</sup> o (AA)<sub>x</sub> que permitan desprender o liberar al componente adicional a valores de pH más bajos, por ejemplo a valores de pH fisiológicos como los aquí definidos. En este contexto se prefiere particularmente que este componente adicional ocurra como ligando L o como componente aminoácido (AA)<sub>x</sub> del componente repetitivo [S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub> de la fórmula (I).

De acuerdo con una última alternativa, el portador polimérico de acuerdo con la fórmula (I) anterior (o de acuerdo con cualquiera de sus fórmulas aquí) puede comprender como componente adicional, de preferencia como componente aminoácido (AA)<sub>x</sub>, cualquier péptido o proteína que pueda realizar cualquier función favorable en la célula. Se prefieren particularmente péptidos o proteínas seleccionados de proteínas o péptidos terapéuticamente activos, de antígenos, por ejemplo antígenos tumorales, antígenos patógenos (antígenos animales, antígenos virales, antígenos protozoarios, antígenos bacterianos, antígenos alérgicos), antígenos autoinmunes o antígenos adicionales, de alérgenos, de anticuerpos, de proteínas o péptidos inmunoestimuladores, de receptores de células T específicos de antígenos, o de cualquier otra proteína o péptido adecuado para una aplicación (terapéutica) específica como la definida abajo para la codificación de ácidos nucleicos. Se prefieren particularmente los epítomos de péptidos de antígenos como los aquí definidos. Asimismo, este componente adicional puede presentarse de preferencia como (AA)<sub>x</sub> como el definido aquí. Alternativamente, este componente adicional también se puede unir a un componente L, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>, P<sup>3</sup> o (AA)<sub>x</sub> como el aquí definido, por ejemplo a una cadena lateral de cualquiera de los componentes L, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>, P<sup>3</sup> o (AA)<sub>x</sub>, de preferencia por medio de una cadena lateral del componente P<sup>2</sup>, u opcionalmente como un enlazador entre los componentes L y P<sup>1</sup> o P<sup>3</sup> y L. La unión a cualquiera de los componentes L, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>, P<sup>3</sup> o (AA)<sub>x</sub> también se puede lograr usando un enlace ácido lábil, de preferencia por medio de una cadena lateral de cualquiera de los componentes L, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>, P<sup>3</sup> o (AA)<sub>x</sub> que permita desprender o liberar el componente adicional a valores de pH más bajos, por ejemplo a valores de pH fisiológicos como los aquí definidos. En este contexto, se prefiere particularmente que este componente adicional se presente como componente de aminoácido (AA)<sub>x</sub> del componente repetitivo [S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub> de la fórmula (I).

El portador polimérico de acuerdo con la fórmula (I) puede comprender al menos uno de los péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos mencionados arriba o componentes adicionales, por ejemplo (AA), donde cualesquiera de las alternativas anteriores pueden combinarse entre sí, y se pueden formar por polimerización en una reacción de condensación de polimerización vía sus partes -SH.

En el complejo de carga portador polimérico inventivo que contiene el ácido nucleico, la molécula portadora polimérica de acuerdo con la fórmula genérica (I) L-P<sup>1</sup>-S-[S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub>-S-P<sup>3</sup>-L como la aquí definida (o de acuerdo con cualquiera de sus sub-fórmulas aquí) y la carga de ácido nucleico se proporcionan típicamente en una relación molar de 5 a 10.000, de preferencia en una relación molar de 5 a 5.000, en especial en una relación molar de 1 a 2.500, todavía más preferiblemente en una relación molar de 5 a 2.000, y con particular preferencia una relación molar de 5 a 1.000, molécula

portadora polimérica:ácido nucleico, o en una relación molar de alrededor de 50 a 1.000 molécula portadora polimérica:ácido nucleico, por ejemplo en una relación molar de alrededor de 10 a 5.000, en una relación molar de aproximadamente 20 a 2.500, en una relación molar de aproximadamente 25 a 2.000 de molécula portadora polimérica:ácido nucleico.

5 Además, en el complejo de carga portador polimérico, la molécula portadora polimérica de acuerdo con la fórmula genérica (I)  $L-P^1-S-[S-P^2-S]_n-S-P^3-L$  como la aquí definida (o de acuerdo con cualquiera de sus sub-fórmulas aquí) y la carga de ácido nucleico se proporcionan de preferencia en una relación N/P de aproximadamente 0,1 a 20, de preferencia en una relación N/P de alrededor de 0,2 a 12, y aún más preferiblemente en una relación N/P de alrededor de 0,4 a 10 ó 0,6 a 5. En este contexto, la relación N/P se define como la relación nitrógeno/fosfato (relación N/P) del complejo de carga portador polimérico completo. Esto es típicamente ilustrativo del contenido/cantidad de péptidos, si se usan péptidos, del portador polimérico y característico del contenido/cantidad de ácidos nucleicos unidos o complejados del complejo de carga portador polimérico. Se puede calcular en base a que, por ejemplo, 1 µg de ARN contiene típicamente alrededor de 3 nmol de residuos fosfato, siempre y cuando el ARN tenga una distribución estadística de bases. Además, 1 µg de péptido contiene típicamente alrededor de  $x \times 1$  µg/M(péptido) nmoles de residuos de nitrógeno, dependiendo del peso molecular y del número x de sus aminoácidos (catiónicos).

En el contexto de la presente invención, esta carga de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico inventivo formado por la carga de ácido nucleico y una molécula portadora polimérica de acuerdo con la fórmula genérica (I) (o de acuerdo con cualquiera de sus sub-fórmulas aquí) puede ser cualquier ácido nucleico adecuado, seleccionado por ejemplo de cualquier ADN, de preferencia, sin limitarse a, por ejemplo ADN genómico, moléculas de ADN de una sola hebra, moléculas de ADN de doble hebra, ADN de codificación, cebadores de ADN, sondas de ADN, ADNp, ADN inmunoestimulador o puede seleccionarse, por ejemplo, de cualquier PNA (ácido péptido nucleico) o puede seleccionarse por ejemplo de cualquier ARN, de preferencia un ARN de codificación, un ARN mensajero (ARNm), un ARNsi, un ARNsh, un ARN antisentido o ribo-activadores, ARN inmunoestimulador (ARNis) ribozimas o aptámeros. El ácido nucleico también puede ser un ARN ribosómico (ARNr), un ARN de transferencia (ARNt), un ARN mensajero (ARNm) o un ARN viral (ARNv). De preferencia, el ácido nucleico es ARN, muy preferiblemente un ARN de codificación. Aún más preferiblemente, el ácido nucleico puede ser un ARN de hebra individual (lineal), todavía más preferiblemente un ARNm. En el contexto de la presente invención, un ARN es típicamente un ARN que está compuesto de varios elementos estructurales, por ejemplo una región 5'-UTR opcional, un sitio de unión ribosómico aguas arriba del extremo 5' seguido por una región de codificación, una región 3'-UTR opcional, que puede ser seguida por una cola poli-A (y/o una cola poli-C). El ARNm puede estar presente como ARN mono-, di- o incluso multi-cistrónico, es decir, un ARN que porta las secuencias de codificación de uno, dos o más proteínas o péptidos (idénticos o diferentes) como los definidos aquí. Estas secuencias de codificación en ARNm di o incluso multi-cistrónico pueden estar separadas por al menos una secuencia IRES (sitio de entrada ribosómico interno).

Además, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico formado por la carga de ácido nucleico y una molécula portadora polimérica de acuerdo con la fórmula genérica (I) (o de acuerdo con cualquiera de sus sub-fórmulas aquí) puede ser un ácido nucleico (molécula) de una sola o doble hebra (que también puede ser considerado como un ácido nucleico (molécula) debido a la asociación no covalente de dos ácidos nucleicos (moléculas) de una sola hebra o un ácido nucleico parcialmente de doble hebra o parcialmente de una sola hebra que son al menos parcialmente auto-complementarios (ambas moléculas de ácido nucleico parcialmente de doble hebra o parcialmente de una sola hebra están formadas típicamente por una molécula de ácido nucleico de una sola hebra más larga y una más corta o por dos moléculas de ácido nucleico de una sola hebra, casi iguales en longitud, donde una molécula de ácido nucleico de hebra individual es en parte complementaria a la otra molécula de ácido nucleico de hebra individual y ambas formas entonces una molécula de ácido nucleico de doble hebra en esta región, es decir, una (molécula) de ácido nucleico parcialmente de doble hebra o parcialmente de una sola hebra. De preferencia, el (la molécula de) ácido nucleico puede ser una molécula de ácido nucleico de una sola hebra. Además, el (la molécula de) ácido nucleico puede ser una molécula de ácido nucleico circular o lineal, de preferencia una molécula de ácido nucleico lineal.

### Ácidos nucleicos de codificación

La molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico puede codificar para una proteína o un péptido, que puede seleccionarse por ejemplo de proteínas o péptidos terapéuticamente activos, seleccionados por ejemplo de proteínas adyuvantes, de antígenos, por ejemplo antígenos tumorales, antígenos patógenos, por ejemplo, seleccionado de antígenos animales, de antígenos virales, de antígenos protozoarios, de antígenos bacterianos), antígenos alergénicos, antígenos autoinmunes o antígenos adicionales, de alérgenos, de anticuerpos, de proteínas o péptidos inmunoestimuladores, de receptores de células T específicos de antígenos, o de cualquier otra proteína o péptido adecuado para una aplicación (terapéutica) específica, donde el ácido nucleico de codificación puede ser transportado a una célula, un tejido o un organismo y la proteína puede ser expresada posteriormente en esta célula, tejido u organismo.

La región de codificación de la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico puede ocurrir como un ácido nucleico mono-, di- o incluso multi-cistrónico, es decir, un ácido nucleico que porte las secuencias de codificación de una, dos o más proteínas o péptidos. Estas secuencias de codificación en los ácidos nucleicos di- o incluso multi-

cistrónicos pueden estar separadas por al menos una secuencia de sitio de entrada de ribosomas interno (IRES), o por péptidos de señal que induzcan el corte del polipéptido resultante que comprende varias proteínas o péptidos.

En aspectos particularmente preferentes, los péptidos o proteínas codificados se seleccionan de proteínas o péptidos humanos, virales, bacterianos o protozoarios.

5

a) Proteínas terapéuticamente activas

En el contexto de la presente invención, las proteínas o péptidos terapéuticamente activos pueden ser codificados por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico aquí definido. Las proteínas terapéuticamente activas se definen aquí como proteínas que tienen un efecto curativo, previenen profilácticamente o tratan terapéuticamente una enfermedad, de preferencia como la aquí definida, o son proteínas de las cuales un individuo tiene necesidad. Estas pueden seleccionarse de cualquier proteína recombinante o aislada de origen natural o diseñadas sintéticamente conocida por el experto en la técnica. Las proteínas terapéuticamente activas pueden comprender proteínas capaces de estimular o inhibir la transducción de señales en la célula, por ejemplo citoquinas, linfoquinas, monoquinas, factores de crecimiento, receptores, moléculas de transducción de señales, factores de transcripción, etc.; anticoagulantes; antitrombinas; proteínas antialérgicas; factores apoptóticos o proteínas relacionadas con la apoptosis, enzimas activas terapéuticas y cualquier proteína relacionada con cualquier enfermedad adquirida o cualquier enfermedad hereditaria.

Particularmente preferentes en este contexto son aquellas proteínas terapéuticamente activas que son beneficiosas para la prevención de la restenosis, por ejemplo timidina quinasa, citosina desaminasa, ligando Fas, CDK2, CDC3, ciclina B, inhibidores de CDK p21 y p27, p16-p27, p53, hRAD 50, etc. o proteínas que reducen la hiperplasia intimal, como el receptor de PDGF beta, TIMP-1, TIMP3, eher t\_PA/ activador plasminógeno tisular), etc. o VEGF, sintetasas de óxido nítrico (eNOS e iNOS), hirudun inhibidor de trombina, TFPI, prostaciclina sintasa (PGIS), COX-1, L-10, II-4, II-11, ADAM8 , 9, 10, 12, 15, 17, 19, 28 y 33.

Además, particularmente preferentes en este contexto son proteínas terapéuticamente activas que son beneficiosas para la prevención de la inflamación, particularmente en el contexto de la aplicación de stents, órganos o articulaciones artificiales.

Una proteína terapéuticamente activa, que puede ser codificada por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico aquí definido, también puede ser una proteína adyuvante. En este contexto, una proteína adyuvante se debe entender de preferencia como cualquier proteína que sea capaz de provocar una respuesta inmune innata como la aquí definida. De preferencia, esta respuesta inmune innata comprende la activación de un receptor de reconocimiento de patrón, por ejemplo un receptor seleccionado de la familia de receptor tipo Toll (TLR), incluyendo por ejemplo un receptor tipo Toll seleccionado de TLR1 a TLR10 humano o de receptores tipo Toll de murino TLR1 a TLR13. Muy preferiblemente, la proteína adyuvante se selecciona de proteínas adyuvantes humanas o de proteínas adyuvantes patógenas seleccionadas del grupo consistente en proteínas bacterianas, proteínas protozoarias, proteínas virales o proteínas fúngicas, proteínas animales, en particular de proteínas adyuvantes bacterianas. Además, también pueden emplearse ácidos nucleicos que codifican para las proteínas humanas implicadas en efectos adyuvantes (por ejemplo, ligandos de receptores de reconocimiento de patrones, receptores de reconocimiento de patrones, proteínas de las vías de transducción de señales, factores de transcripción o citoquinas).

b) Antígenos

La molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico definido aquí alternativamente puede codificar para un antígeno. De acuerdo con la presente invención, el término "antígeno" se refiere a una sustancia que es reconocida por el sistema inmunológico y es capaz de desencadenar una respuesta inmunológica específica de antígeno, por ejemplo por la formación de anticuerpos o células T específicas de antígenos, como parte de una respuesta inmune adaptiva. En este contexto un epítopo antigénico, fragmento o péptido de una proteína significa particularmente epítopos de células B y células T que pueden ser reconocidos por células B, anticuerpos o células T, respectivamente.

En el contexto de la presente invención, antígenos como los codificados por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico aquí definido comprenden típicamente cualquier antígeno, epítopo antigénico o péptido antigénico, éste bajo la definición anterior, muy preferiblemente antígenos de proteínas y péptidos, por ejemplo antígenos de tumor, antígenos alergénicos, auto-antígenos autoinmunes, antígenos patógenos, etc. En particular antígenos como los codificados por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico aquí definido pueden ser antígenos generados fuera de la célula, más típicamente antígenos no derivados del propio organismo anfitrión (por ejemplo un humano) (es decir no auto-antígenos) sino derivados de células huésped fuera del organismo anfitrión, por ejemplo antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos protozoológicos, antígenos animales, antígenos alergénicos, etc. Los antígenos alergénicos (antígenos de alergia) son típicamente antígenos que causan una alergia en un humano y pueden derivarse ya sea de un humano u otras fuentes. Además, los antígenos codificados por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico aquí definido pueden ser además antígenos

generados dentro de la célula, como el tejido o el cuerpo. Estos antígenos incluyen antígenos derivados del propio organismo anfitrión (por ejemplo un humano), por ejemplo antígenos de tumor, auto-antígenos o antígenos propios, tales como auto-antígenos auto-inmunes, etc., pero también (no auto) antígenos como los aquí definidos que hayan sido originalmente derivados de células huésped fuera del organismo anfitrión pero que sean fragmentados o degradados dentro del cuerpo, tejido o células, por ejemplo por degradación (proteasas), metabolismo, etc.

Una clase de antígenos codificados por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico aquí definido comprende antígenos de tumor. Los "antígenos de tumor" se encuentran preferentemente sobre la superficie de la célula (tumoral). Los antígenos tumorales pueden seleccionarse también de proteínas que son sobre-expresadas en las células tumorales en comparación con una célula normal. Además, los antígenos tumorales incluyen también antígenos expresados en células que a su vez no son (eran) (u originalmente no ellas mismas) degeneradas, sino asociadas con el supuesto tumor. Antígenos que están relacionados con vasos de suministro de tumor o reformación de los mismos, en particular aquellos antígenos que están asociados con neovascularización, por ejemplo, factores de crecimiento, tales como VEGF, bFGF, etc., también se incluyen aquí. Los antígenos relacionados con un tumor incluyen además antígenos de células o tejidos típicamente embebidos en el tumor. Además, algunas sustancias (normalmente proteínas o péptidos) son expresadas en pacientes que sufren (con o sin conocimiento) de una enfermedad cancerosa y se presentan en concentraciones incrementadas en los fluidos corporales de estos pacientes. Estas sustancias también se conocen como "antígenos tumorales", sin embargo no son antígenos en el estricto significado de una sustancia inductora de una respuesta inmune. La clase de antígenos tumorales puede dividirse además en antígenos específicos de tumor (TSA) y antígenos asociados a tumor (TAA). Los TSA sólo pueden aparecer en células tumorales y nunca en células "saludables" normales. Son típicamente resultado de una mutación específica en el tumor. Los TAA más comunes normalmente se presentan en células tanto tumorales como sanas. Estos antígenos son reconocidos y la célula presentadora de antígeno puede ser destruida por células T citotóxicas. Además, los antígenos tumorales también pueden presentarse sobre la superficie del tumor en forma de, por ejemplo, un receptor mutado. En este caso, pueden ser reconocidos por anticuerpos.

De acuerdo con un aspecto preferente, estos antígenos de tumor codificados por el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico se seleccionan del grupo consistente en 5T4, 707-AP, 9D7, AFP, AlbZIP HPG1, alfa-5-beta-1-integrina, alfa-5-beta-6-integrina, alfa-actinina-4/m, alfa-metilacil-coenzima A racemasa, ART-4, ARTC1/m, B7H4, BAGE-1, BCL-2, bcr/abl, beta-catenina/m, BING-4, BRCA1/m, BRCA2/m, CA 15-3/CA 27-29, CA 19-9, CA72-4, CA125, calreticulina, CAMEL, CASP-8/m, cathepsina B, cathepsina L, CD19, CD20, CD22, CD25, CDE30, CD33, CD4, CD52, CD55, CD56, CD80, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CEA, CLCA2, CML28, CML66, COA-1/m, proteína tipo coactosina, collage XXIII, COX-2, CT-9/BRD6, Cten, ciclina B1, ciclina D1, cyp-B, CYPB1, DAM-10, DAM-6, DEK-CAN, EFTUD2/m, EGFR, ELF2/m, EMMPRIN, EpCam, EphA2, EphA3, ErbB3, ETV6-AML1, EZH2, FGF-5, FN, Frau-1, G250, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE7b, GAGE-8, GDEP, GnT-V, gp100, GPC3, GPNMB/m, HAGE, HAST-2, hepsina, Her2/neu, HERV-K-MEL, HLA-A\*0201-R171, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HNE, homeobox NKX3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HPV-E6, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT, iCE, IGF-1R, IL-13Ra2, IL-2R, IL-5, receptor de laminina inmaduro, caliceína-2, caliceína-4, Ki67, KIAA0205, KIAA0205/m, KK-LC-1, K-Ras/m, LAGE-A1, LDLR-FUT, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGE-B17, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2, mamaglobina A, MART-1/melan-A, MART-2, MART-2/m, proteína de matriz 22, MC1R, M-CSF, ME1/m, mesotelina, MG50/PXDN, MMP11, MN/CA IX-antígeno, MMRP-3, MUC-1, MUC-2, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, miosina clase I/m, NA88-A, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, Neo-PAP, Neo-PAP/m, NFYC/m, NGEP, NMP22, NPM/ALK, N-Ras/m, NSE, NY-ESO-1, NY-ESO-B, OA1, OFA-iLRP, OGT, OGT/m, OS-9, OS-9/m, osteocalcina, osteopontina, p15, p190 minor bcr-abl, p53, p53/m, PAGE-4, Pal-1, PAI-2, PART-1, PATE, PDEF, Pim-1-cinasa, Pin-1, Pml/PARalfa, POTE, PRAME, PRDX5/m, prosteína, proteinasa-3, PSA, PSCA, PSGR, PSM, PSMA, PTPRK/m, RAGE-1, RBAF600/m, RHAMM/CD168, RU1, RU2, S-100, SAGE, SART-1, SART-2, SART-3, SCC, SIRT2/m, Sp17, SSX-1, SSX-2/HOM-MEL-40, SSX-4, STAMP-1, STEAP, survivina, survivina-2B, SYT-SSX-1, SYT-SSX-2, TA-90, TAG-72, TARP, TEL-AML1, TGFbeta, TGFbetaRII, TGM-4, TPI/m, TRAG-3, TRG, TRP-1, TRP-2/6b, TRP/INT2, TRP-p8, tirosinasa, UPA, VEGF, VEGFR-2/FLK-1 y WT1, o un fragmento, variante o epitopo de los mismos. Los epítomos comprenden 5 a 15, de preferencia 5 a 12, muy preferiblemente 6 a 9 aminoácidos del antígeno, de preferencia en su forma nativa.

De acuerdo con otra alternativa, una clase más de antígenos codificados por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico aquí definido comprende antígenos alérgicos. Estos antígenos alérgicos pueden seleccionarse de antígenos derivados de diferentes fuentes, por ejemplo de animales, plantas, hongos, bacterias. Los alérgenos en este contexto incluyen por ejemplo hierbas, pólenes, mohos, fármacos o numerosos activadores ambientales. Los antígenos alérgicos típicamente pertenecen a diferentes clases de compuestos, tales como ácidos nucleicos y sus fragmentos, proteínas o péptidos y sus fragmentos, carbohidratos, polisacáridos, azúcares, lípidos, fosfolípidos. De particular interés son los antígenos que pueden ser codificados por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico, es decir antígenos de proteínas o péptidos y sus fragmentos o epítomos, o ácidos nucleicos y sus fragmentos, particularmente ácidos nucleicos y sus fragmentos, que codifican para estos antígenos de proteínas o péptidos y sus fragmentos o epítomos.

c) Anticuerpos

De acuerdo con otra alternativa, la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico aquí definido puede codificar para un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. Este anticuerpo puede seleccionarse de cualquier anticuerpo, por ejemplo cualquier anticuerpo producido recombinantemente o de origen natural, conocido en la técnica, en particular anticuerpos adecuados para propósitos terapéuticos, de diagnóstico o científicos, o anticuerpos que hayan sido identificados en relación con enfermedades cancerosas específicas. Aquí, el término "anticuerpo" se usa en su sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales y policlonales (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y bloqueadores o neutralizantes) y especies de anticuerpos con especificidad epitópica. De acuerdo con la invención, el término "anticuerpo" comprende típicamente cualquier anticuerpo conocido en la técnica (por ejemplo, anticuerpos IgM, IgD, IgG, IgA e IgE), tales como anticuerpos de origen natural, anticuerpos generados por inmunización en un organismo anfitrión, anticuerpos que fueron aislados e identificados a partir de anticuerpos de origen natural o anticuerpos generados por inmunización en un organismo anfitrión y producidos recombinantemente por métodos biomoleculares conocidos en la técnica, así como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos biespecíficos, intracuerpos, es decir, anticuerpos expresados en células y ubicados opcionalmente en compartimientos celulares específicos, y fragmentos y variantes de los anticuerpos mencionados arriba. En general, un anticuerpo consiste en una cadena ligera y una cadena pesada ambas con dominios variables y constantes. La cadena ligera consiste en un dominio variable N-terminal,  $V_L$ , y un dominio constante C-terminal,  $C_L$ . En contraste, la cadena pesada del anticuerpo IgG, por ejemplo, comprende un dominio variable N-terminal,  $V_H$ , y tres dominios constantes,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ .

En el contexto de la presente invención, anticuerpos como los codificados por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico aquí definido pueden comprender de preferencia anticuerpos de longitud completa, es decir, anticuerpos compuestos de las cadenas pesada completa y ligera completa, como se describió arriba. Sin embargo, derivados de anticuerpos tales como fragmentos, variantes o aductos de anticuerpos también pueden ser codificados por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico aquí definido. Los fragmentos de anticuerpo se seleccionan de preferencia de fragmentos Fab, Fab',  $F(ab')_2$ , Fc, Fabb, pFc', Fd y Fv de los anticuerpos (de longitud completa) mencionados anteriormente. En general, los fragmentos de anticuerpo se conocen en la técnica. Por ejemplo, un fragmento de Fab ("fragmento de unión a antígeno") está compuesto de un dominio constante y uno variable de cada una de las cadenas pesada y ligera. Los dos dominios variables se unen al epítipo en antígenos específicos. Las dos cadenas están únicas mediante un enlace disulfuro. Un fragmento scFv ("fragmento variable de cadena individual"), por ejemplo, consiste típicamente en los dominios variables de las cadenas ligera y pesada. Los dominios son enlazados por un enlace artificial, en general un enlace de polipéptidos tales como un péptido compuesto de 15-25 residuos de glicina, prolina y/o serina.

En el presente contexto es preferible que las diferentes cadenas del anticuerpo o fragmento de anticuerpo sean codificadas por una molécula de ácido nucleico multi-cistrónica. Alternativamente, las diferentes cadenas del anticuerpo o fragmento de anticuerpo son codificadas por varios ácidos nucleicos mono-cistrónicos (secuencias).

**ARNsi:**

De acuerdo con otra alternativa particularmente preferente, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico formado por la carga de ácido nucleico y una molécula portadora polimérica de acuerdo con la fórmula genérica (I) (o de acuerdo con sus sub-fórmulas aquí) puede estar en forma de ARNs, de preferencia ARNsi. Un ARNs, o un ARNsi, es de interés particular en relación con el fenómeno de interferencia de ARN. La técnica *in vitro* de interferencia de ARN (ARNi) se basa en moléculas de ARN de doble hebra (ARNds) que desencadenan la supresión específica de la secuencia de expresión génica (Zamore (2001) Nat. Struct. Biol. 9: 746-750; Sharp (2001) Genes Dev. 5:485-490; Hannon (2002) Nature 41:244-251). En la transfección de células de mamífero con ARNs largo, la activación de la proteína quinasa R y RnasaL ocasiona efectos no específicos, tales como una respuesta a interferón (Stark y col. (1998) Annu. Rev. Biochem. 67:227-264; He y Katze (2002) Viral Immunol. 15:95-119). Estos efectos no específicos se evitan cuando se usa el llamado ARNsi de cadena más corto, por ejemplo 21 a 23 mer (ARN de interferencia pequeño), debido a que los efectos inespecíficos no son desencadenados por ARNsi que es más corto que 30 pb (Elbashir y col. (2001) Nature 411:494-498).

Así, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico puede ser un ARN de doble hebra (ARNds) que tenga una longitud de 17 a 29, de preferencia de 19 a 25 y preferentemente que sea al menos un 90%, muy preferentemente 95% y especialmente 100% (de los nucleótidos de un ARNs) complementario a una sección de la secuencia de ácido nucleico de una proteína o antígeno (terapéuticamente relevante) descrito anteriormente aquí (como ingrediente activo), ya sea una sección de codificación o no de codificación, de preferencia una sección de codificación. 90% complementario significa que con una longitud de un ARNs descrito aquí de por ejemplo 20 nucleótidos, éste contiene no más de 2 nucleótidos sin complementariedad correspondiente con la sección correspondiente del ARNm. La secuencia del ARN de doble hebra usado de acuerdo con la invención como el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención es, sin embargo, de preferencia, completamente complementaria en su estructura general con una sección del ácido nucleico de una proteína o antígeno terapéuticamente relevante descrito anteriormente aquí. En este contexto, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico formado por la carga de ácido nucleico y una molécula portadora

5 polimérica de acuerdo con la fórmula genérica (I) puede ser un ARNs que tenga la estructura general 5'-(N<sub>17-29</sub>)-3', de preferencia que tenga la estructura general 5'-(N<sub>19-25</sub>)-3', muy preferiblemente que tenga la estructura general 5'-(N<sub>19-24</sub>)-3', o aún más preferiblemente que tenga la estructura general 5'-(N<sub>21-23</sub>)-3', donde en cada estructura general cada N es un nucleótido (de preferencia diferente) de una sección del ARNm de una proteína o antígeno terapéuticamente relevante descrito anteriormente aquí que se selecciona de preferencia de un número continuo de 17 a 29 nucleótidos del ARNm de una proteína o antígeno terapéuticamente relevante y que está presente en la estructura general 5'-(N<sub>17-29</sub>)-3' en su orden natural. En principio, todas las secciones que tienen una longitud de 17 a 29, de preferencia de 19 a 25, pares de bases que ocurren en la región de codificación del ARNm pueden servir como secuencia objetivo para un ARNs aquí. Igualmente, las moléculas de ARNs usadas como ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención también pueden ser dirigidas contra secuencias de nucleótidos de una proteína o antígeno (terapéuticamente relevante) descrita anteriormente aquí (como un ingrediente activo) que no se encuentran en la región de codificación, en particular en la región de no codificación 5' del ARNm, por ejemplo, por tanto, contra regiones de no codificación del ARNm con función reguladora. La secuencia objetivo del ARNs usado como ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención puede por tanto caer en la región traducida y no traducida del ARN y/o en la región de los elementos de control de una proteína o antígeno descrito anteriormente aquí. La secuencia objetivo de un ARNs usado como ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención también puede situarse en la región de superposición de una secuencia no traducida y traducida; en particular, la secuencia objetivo puede comprender al menos un nucleótido aguas abajo del triplete de inicio de la región de codificación del ARNm.

20 En el contexto de la presente invención, ARNs dirigido contra, por ejemplo PDGF, VEGF, ICAM-1, VCAM-1, E-selektin, TNFa, IL-6 (en principio todas las MMP de interleuquinas pro inflamatorias, etc.) para prevenir la restenosis es particularmente preferente.

### Ácidos nucleicos inmunoestimuladores

#### a) Ácidos nucleicos CpG inmunoestimuladores

25 De acuerdo con otra alternativa, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico formado por la carga de ácido nucleico y una molécula portadora polimérica de acuerdo con la fórmula genérica (I) (o de acuerdo con cualquiera de sus sub-fórmulas aquí) puede estar en forma de un ácido nucleico CpG (inmunoestimulador), en particular CpG-ARN o CpG-ADN, que induzca de preferencia una respuesta inmune innata. El CpG-ARN o CpG-ADN puede ser un CpG-ADN de una sola hebra (ss CpG-ADN), un CpG-ADN de doble hebra (ADNs), un CpG-ARN de hebra individual (ss CpG-ARN) o un CpG-ARN de doble hebra (ds CpG-ARN). El ácido nucleico CpG está de preferencia en forma de CpG-ARN, muy preferiblemente en forma de CpG-ARN de hebra individual (ss CpG-ARN). También preferentemente, estos ácidos nucleicos CpG tienen una longitud como la descrita arriba. De preferencia, los motivos CpG no están metilados.

#### b) ARN inmunoestimulador (ARNis):

35 Asimismo, de acuerdo con una alternativa más, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico formado por la carga de ácido nucleico y una molécula portadora polimérica de acuerdo con la fórmula genérica (I) (o de acuerdo con cualquiera de sus sub-fórmulas aquí) puede estar en forma de un ARN inmunoestimulador (ARNis), de preferencia que provoca una respuesta inmune innata. Este ARN inmunoestimulador puede ser cualquier ARN (doble hebra o hebra individual), por ejemplo un ARN de codificación como el aquí definido. De preferencia, el ARN inmunoestimulador puede ser un ARN de hebra individual, de doble hebra o parcialmente de doble hebra, muy preferiblemente un ARN de hebra individual, y/o un ARN circular o lineal, muy preferiblemente un ARN lineal. Preferentemente, el ARN inmunoestimulador puede ser un ARN de hebra individual (lineal). Aún más preferiblemente, el ARN inmunoestimulador puede ser un ARN de no codificación de hebra individual (largo) (lineal). En este contexto, se prefiere particularmente que el ARNis porte un trifosfato en su extremo 5' que es el caso para ARN transcrito *in vitro*. Un ARN inmunoestimulador también puede ocurrir como un oligonucleótido de ARN corto como el aquí definido. Un ARN inmunoestimulador según se usa aquí puede seleccionarse además de cualquier clase de moléculas de ARN encontradas en la naturaleza o que se preparen sintéticamente y que puedan inducir una respuesta inmune innata y puedan soportar una respuesta inmune adaptativa inducida por un antígeno. En este contexto, una respuesta inmune se puede presentar de varias maneras. Un factor sustancial para una respuesta inmune (adaptativa) adecuada es la estimulación de diferentes sub-poblaciones de células T. Los linfocitos T se dividen típicamente en dos sub-poblaciones, las células T auxiliares 1 (Th1) y las células T auxiliares 2 (Th2), con las cuales el sistema inmunológico es capaz de destruir patógenos intracelulares (Th1) y extracelulares (Th2) (por ejemplo, antígenos). Las sub-poblaciones de células Th difieren en el patrón de las proteínas efectoras (citoquinas) producidas por ellos. Así, las células Th1 ayudan a la respuesta inmune celular mediante la activación de macrófagos y células T citotóxicas. Las células Th2, por otro lado, promueven la respuesta inmune humoral mediante la estimulación de células B para conversión en células plasmáticas y mediante la formación de anticuerpos (por ejemplo, contra antígenos). La relación Th1/Th2 es por tanto de gran importancia en la inducción y mantenimiento de una respuesta inmune adaptativa. La relación Th1/Th2 de la respuesta inmune (adaptativa) se desplaza de preferencia en la dirección hacia la respuesta celular (respuesta Th1), induciendo así una respuesta inmune celular. De acuerdo con un ejemplo, el sistema inmunológico innato que puede soportar una respuesta inmune adaptativa puede ser activado por ligandos de receptores tipo Toll (TLRs). Los TLRs son una familia de polipéptidos receptores de reconocimiento de patrón (PRR) altamente



conservados que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y juegan un papel crítico en la inmunidad innata en mamíferos. Actualmente se han identificado al menos trece miembros de familia, designados TLR1-TLR13 (receptores tipo Toll: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13). Además, se ha identificado un número de ligandos TLR específicos. Por ejemplo, se encontró que ADN bacteriano no metilado y análogos sintéticos del mismo (ADN CpG) son ligandos para TLR9 (Hemmi H y col.(2000) Nature 408:740-5; Bauer S y col.(2001) Proc NatlAcadSci E.U.A. 98, 9237-42). Más aún, se ha reportado que ligandos para ciertos TLRs incluyen ciertas moléculas de ácido nucleico y que ciertos tipos de ARN son inmunoestimuladores de una manera independiente de secuencia o dependiente de secuencia, donde estas diferentes moléculas de ARN inmunoestimuladoras pueden por ejemplo estimular TLR3, TLR7 o TLR8, o receptores intracelulares tales como RIG-I, MDA-5, etc. Por ejemplo, Lipford y col. determinaron ciertos oligorribonucleótidos que contienen G, U como inmunoestimuladores al actuar por medio de TLR7 y TLR8 (véase WO 03/086280). Los oligorribonucleótidos que contienen G, U inmunoestimuladores descritos por Lipford y col. se creía que eran derivables de fuentes de ARN incluyendo ARN ribosómico, ARN de transferencia, ARN mensajero y ARN viral.

El ARN inmunoestimulador (ARNis) usado como la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico formado por la carga de ácido nucleico y una molécula portadora polimérica de acuerdo con la fórmula genérica (I) (o de acuerdo con cualquiera de sus sub-fórmulas aquí) puede entonces comprender cualquier secuencia de ARN conocida como inmunoestimuladora, incluyendo secuencias de ARN que representen y/o codifiquen para ligandos de TLRs, preferentemente seleccionadas de miembros de la familia humana TLR1-TLR10 o miembros de la familia murina TLR1-TLR13, en especial seleccionados de miembros de la familia (humana) TLR1-TLR10, en particular de TLR7 y TLR8, ligandos para receptores intracelulares para ARN (tales como RIG-1 o MDA-5, etc.) (véase por ejemplo Meylan, E., Tschopp, J. (2006), Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. Mol. Cell 22, 561-569), o cualquier otra secuencia de ARN inmunoestimuladora. Además, (clases de) moléculas de ARN inmunoestimuladoras usadas como la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico pueden incluir cualquier otro ARN capaz de provocar una respuesta inmune. Sin limitarse a ello, este ARN inmunoestimulador puede incluir ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt), ARN mensajero (ARNm) y ARN viral (ARNv). Este ARN inmunoestimulador puede comprender una longitud de 1.000 a 5.000, de 500 a 5.000, de 5 a 5.000, o de 5 a 1.000, 5 a 500, 5 a 250, de 5 a 100, de 5 a 50 o de 5 a 30 nucleótidos.

De acuerdo con un aspecto particularmente preferente de esta realización de la presente invención, las secuencias de ácido nucleico inmunoestimuladoras, que son secuencias de ADN o ARN, particularmente ARNis, consisten en o comprenden un ácido nucleico de fórmula (III) o (IV):



donde

G es guanosina, uracilo o un análogo de guanosina o uracilo;

X es guanosina, uracilo, adenosina, timidina, citosina o un análogo de los nucleótidos mencionados anteriormente;

l es un entero de 1 a 40, donde

cuando  $l = 1$  G es guanosina o un análogo de la misma,

cuando  $l > 1$  al menos el 50% de los nucleótidos son guanosina o un análogo de la misma;

m es un entero y es al menos 3, donde

cuando  $m = 3$  X es uracilo o un análogo del mismo,

cuando  $m > 3$  están presentes al menos 3 uracilos sucesivos o análogos de uracilo;

n es un entero de 1 a 40, donde

cuando  $n = 1$  G es guanosina o un análogo de la misma,

cuando  $n > 1$  al menos el 50% de los nucleótidos son guanosina o un análogo de la misma.



donde

C es citosina, uracilo o un análogo de citosina o uracilo;

X es guanosina, uracilo, adenosina, timidina, citosina o un análogo de los nucleótidos mencionados anteriormente;

l es un entero de 1 a 40, donde

cuando  $l = 1$  C es citosina o un análogo de la misma,

cuando  $l > 1$  al menos el 50% de los nucleótidos son citosina o un análogo de la misma;

m es un entero y es al menos 3, donde

cuando  $m = 3$  X es uracilo o un análogo del mismo,

cuando  $m > 3$  están presentes al menos 3 uracilos sucesivos o análogos de uracilo;

n es un entero de 1 a 40, donde

cuando  $n = 1$  C es citosina o un análogo de la misma,

cuando  $n > 1$  al menos el 50% de los nucleótidos son citosina o un análogo de la misma.

Los ácidos nucleicos de la fórmula (III) o (IV), que se pueden usar como la carga de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico pueden ser moléculas de ácido nucleico relativamente cortas con una longitud típica de aproximadamente 5 a 100 (pero también pueden ser de longitud superior a 100 nucleótidos en realizaciones específicas,

por ejemplo de hasta 200 nucleótidos), de 5 a 90 o de 5 a 80 nucleótidos, de preferencia una longitud de aproximadamente 5 a 70, en especial una longitud de alrededor de 8 a 60 y en particular una longitud de alrededor de 15 a 60 nucleótidos, muy preferiblemente de 20 a 60, con especial preferencia de 30 a 60 nucleótidos. Si el ácido nucleico del complejo de carga de ácido nucleico de la invención tiene una longitud máxima de por ejemplo 100 nucleótidos, m es típicamente  $\leq 98$ .

5 El número de nucleótidos G en el ácido nucleico de fórmula (III) viene determinado por l o n. l y n, independientemente uno del otro, son en cada caso un entero de 1 a 40, donde cuando l o n = 1 G es guanosina o un análogo de la misma, y cuando l o n > 1 al menos el 50% de los nucleótidos son guanosina o un análogo de la misma. Por ejemplo, sin implicar ninguna limitación, cuando l o n = 4 G<sub>l</sub> o G<sub>n</sub> pueden ser, por ejemplo, GUGU, GGUU, UGUG, UUGG, GUUG, GGGU, GGUG, GUGG, UGGG o GGGG; etc.; cuando l o n = 5 G<sub>l</sub> o G<sub>n</sub> pueden ser, por ejemplo, GGGUU, GGUGU, GUGGU, UGGGU, UGGUG, UGUGG, UUGGG, GUGUG, GGGGU, GGUG, GGUGG, GUGGG, UGGGG o GGGGG.

10 Preferentemente, un nucleótido adyacente a X<sub>m</sub> en el ácido nucleico de fórmula (III) de acuerdo con la invención no es uracilo. De forma similar, el número de nucleótidos C en el ácido nucleico de la fórmula (IV) de acuerdo con la invención viene determinado por l o n. l y n, independientemente uno del otro, son en cada caso un entero de 1 a 40, donde cuando l o n = 1 C es citosina o un análogo de la misma y cuando l o n > 1 al menos el 50% de los nucleótidos son citosina o un análogo de la misma. Por ejemplo, sin implicar ninguna limitación, cuando l o n = 4, C<sub>l</sub> o C<sub>n</sub> pueden ser, por ejemplo, CUCU, CCUU, UCUC, UUCC, CUUC, CCCU, CCUC, CUCC, UCCC o CCCC, etc.; cuando l o n = 5 C<sub>l</sub> o C<sub>n</sub> pueden ser, por ejemplo, CCCUU, CCUCU, CUCCU, UCCCU, UCCUC, UCUC, UCCCC, CUCUC, CCCCC, CCCUC, CCUCC, CUCCC, UCCCC o CCCCC. Preferentemente, un nucleótido adyacente a X<sub>m</sub> en el ácido nucleico de la fórmula (IV) de acuerdo con la invención no es uracilo. Preferiblemente, para la fórmula (III), cuando l o n > 1, al menos el 60%, 70%, 80%, 90% o incluso el 100% de los nucleótidos son guanosina o un análogo de la misma, como se definió arriba. Los nucleótidos restantes hasta el 100% (cuando guanosina constituye menos del 100% de los nucleótidos) en las secuencias flanqueantes G<sub>l</sub> y/o G<sub>n</sub> son uracilo o un análogo del mismo, como se ha definido aquí anteriormente. También de preferencia, l y n, independientemente uno del otro, son en cada caso un entero de 2 a 30, muy preferiblemente un entero de 2 a 20 y todavía más preferiblemente un entero de 2 a 15. El límite inferior de l o n puede variarse si es necesario y es al menos 1, de preferencia al menos 2, muy preferiblemente al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10. Esta definición se aplica correspondientemente a la fórmula (IV).

De acuerdo con un aspecto particularmente preferente adicional de esta realización, las secuencias de ácidos nucleicos inmunoestimuladores, que son secuencias de ADN o ARN, particularmente ARNs, consisten en o comprenden un ácido nucleico de fórmula (V) o (VI):

30 **(N<sub>u</sub>G<sub>l</sub>X<sub>m</sub>G<sub>n</sub>N<sub>v</sub>)<sub>a</sub>, (fórmula V)**

donde

G es guanosina (guanina), uridina (uracilo) o un análogo de guanosina (guanina) o uridina (uracilo), preferentemente guanosina (guanina) o un análogo de la misma;

35 X es guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina), o un análogo de estos nucleótidos (nucleósidos), preferentemente uridina (uracilo) o un análogo del mismo;

N es una secuencia de ácido nucleico de una longitud de alrededor de 4 a 50, de preferencia alrededor de 4 a 40, muy preferiblemente alrededor de 4 a 30 ó 4 a 20 ácidos nucleicos, seleccionándose cada N independientemente de guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de estos nucleótidos (nucleósidos);

40 a es un entero de 1 a 20, preferentemente de 1 a 15, en especial de 1 a 10;

l es un entero de 1 a 40, donde cuando l = 1, G es guanosina (guanina) o un análogo de la misma; cuando l > 1, al menos el 50% de estos nucleótidos (nucleósidos) son guanosina (guanina) o un análogo de la misma;

m es un entero y es al menos 3; donde cuando m = 3, X es uridina (uracilo) o un análogo de la misma y cuando m > 3, están presentes al menos 3 uridinas (uracilos) sucesivas o análogos de uridina (uracilo);

45 n es un entero de 1 a 40, donde cuando n = 1, G es guanosina (guanina) o un análogo de la misma, cuando n > 1, al menos el 50% de estos nucleótidos (nucleósidos) son guanosina (guanina) o un análogo de la misma;

u, v pueden ser independientemente un entero de 0 a 50, preferentemente donde cuando u = 0, v  $\geq 1$ , o cuando v = 0, u  $\geq 1$ ;

50 donde la molécula de ácido nucleico de fórmula (V) tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos, de preferencia al menos 100 nucleótidos, muy preferiblemente al menos 150 nucleótidos, todavía más preferiblemente al menos 200 nucleótidos y más preferiblemente al menos 250 nucleótidos.

**(N<sub>u</sub>C<sub>l</sub>X<sub>m</sub>C<sub>n</sub>N<sub>v</sub>)<sub>a</sub> (fórmula VI)**

donde

55 C es citidina (citosina), uridina (uracilo) o un análogo de citidina (citosina) o uridina (uracilo), de preferencia citidina (citosina) o un análogo de la misma;

X es guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de los nucleótidos (nucleósidos) mencionados arriba, de preferencia uridina (uracilo) o un análogo de la misma;

## ES 2 719 598 T3

- N es en cada caso, independientemente, una secuencia de ácido nucleico de una longitud de alrededor de 4 a 50, de preferencia alrededor de 4 a 40, muy preferiblemente alrededor de 4 a 30 ó 4 a 20 ácidos nucleicos, seleccionándose cada N independientemente de guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de estos nucleótidos (nucleósidos);
- 5 a es un entero de 1 a 20, de preferencia de 1 a 15, muy preferiblemente de 1 a 10;
- l es un entero de 1 a 40, donde cuando  $l = 1$ , C es citidina (citosina) o un análogo de la misma, cuando  $l > 1$ , al menos el 50% de estos nucleótidos (nucleósidos) son citidina (citosina) o un análogo de la misma;
- m es un entero y es al menos 3; donde cuando  $m = 3$ , X es uridina (uracilo) o un análogo de la misma, cuando  $m > 3$ , están presentes al menos 3 uridinas (uracilos) o análogos de uridina (uracilo) sucesivos;
- 10 n es un entero de 1 a 40, donde cuando  $n = 1$ , C es citidina (citosina) o un análogo de la misma, cuando  $n > 1$ , al menos el 50% de estos nucleótidos (nucleósidos) son citidina (citosina) o un análogo de la misma;
- u, v pueden ser independientemente uno del otro un entero de 0 a 50, preferentemente donde cuando  $u = 0$ ,  $v \geq 1$ , o cuando  $v = 0$ ,  $u \geq 1$ ;
- 15 donde la molécula de ácido nucleico de fórmula (VI) de acuerdo con la invención tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos, de preferencia al menos 100 nucleótidos, muy preferiblemente de al menos 150 nucleótidos, todavía más preferiblemente de al menos 200 nucleótidos y con total preferencia de al menos 250 nucleótidos.

Para la fórmula (VI), cualquiera de las definiciones dadas para los elementos N (es decir,  $N_u$  y  $N_v$ ) y X ( $X_m$ ), particularmente la estructura central definida arriba, así como para los enteros a, l, m, n, u y v, se aplica similarmente a los elementos de la fórmula (V) correspondientemente, donde en la fórmula (VI) la estructura central está definida por  $C_l X_m C_n$ . La definición de los elementos frontera  $N_u$  y  $N_v$  es idéntica a las definiciones dadas arriba para  $N_u$  y  $N_v$ .

20

De acuerdo con un aspecto particularmente preferente de esta realización, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (V), que es un ADN o un ARN, puede seleccionarse por ejemplo de cualquiera de las siguientes secuencias:

UAGCGAAGCUCUUGGACCUAGGUUUUUUUUUUUUUUUUGGGUGCGUCCUAGAAG  
UACACG (SEQ ID NO: 118)

UAGCGAAGCUCUUGGACCUAGGUUUUUUUUUUUUUUUUGGGUGCGUCCUAGAAG  
UACACGAUCGCUUCGAGAACCUGGAUCCAAAAAAAAAAAAAAAAACCCACGCAAGGAUCU  
UCAUGUGC (SEQ ID NO: 119)

GGGAGAAAGCUCAAGCUUGGAGCAAUGCCCCGCACAUUGAGGAAACCGAGUUGCAUA  
UCUCAGAGUAUUGGCCCCCGUGUAGGUUAUUCUUGACAGACAGUGGAGCUUAUUCA  
CUCCCAGGAUCCGAGUCGCAUACUACGGUACUGGUGACAGACCUAGGUCGUCAGUU

GACCAGUCCGCCACUAGACGUGAGUCCGUCAAAGCAGUUAGAUGUUACACUCUAUUA  
GAUC (SEQ ID NO: 120)

GGGAGAAAGCUCAAGCUUGGAGCAAUGCCCCGCACAUUGAGGAAACCGAGUUGCAUA  
UCUCAGAGUAUUGGCCCCCGUGUAGGUUAUUCUUGACAGACAGUGGAGCUUAUUCA  
CUECCAGGAUCCGAGUCGCAUACUACGGUACUGGGUGACAGACCUAGGUCGUCAGUU  
GACCAGUCCGCCACUAGACGUGAGUCCGUCAAAGCAGUUAGAUGUUACACUCUAUUA  
GAUCUCGGAUUACAGCUGGAAGGAGCAGGAGUAGUGUUCUUGCUCUAAGUACCGAG  
UGUGCCCCAAUACCCGAUCAGCUUAUUAACGAACGGCUCUCCUCUUAAGACUGCAGCG  
UAAGUGCGGAAUCUGGGGAUCAAAUUAACUGACUGCCUGGAUUACCCUCGGACAUAU  
AACCUUGUAGCACGCUGUUGCUGUAUAGGUGACCAACGCCACUCGAGUAGACCAGC  
UCUCUUAAGUCCGGACAAUGAUAGGAGGGCGCGGUCAAUCUACUUCUGGCUAGUUAAG  
AAUAGGCUGCACCCGACCUCUAUAAGUAGCGUGUCCUCUAGAGCUACGCAGGUUCGC

GGGAGAAAGCUCAAGCUUGGAGCAAUGCCCCGCACAUUGAGGAAACCGAGUUGCAUA  
UCUCAGAGUAUUGGCCCCCGUGUAGGUUAUUCUUGACAGACAGUGGAGCUUAUUCA  
CUECCAGGAUCCGAGUCGCAUACUACGGUACUGGGUGACAGACCUAGGUCGUCAGUU  
GACCAGUCCGCCACUAGACGUGAGUCCGUCAAAGCAGUUAGAUGUUACACUCUAUUA  
GAUCUCGGAUUACAGCUGGAAGGAGCAGGAGUAGUGUUCUUGCUCUAAGUACCGAG  
UGUGCCCCAAUACCCGAUCAGCUUAUUAACGAACGGCUCUCCUCUUAAGACUGCAGCG  
UAAGUGCGGAAUCUGGGGAUCAAAUUAACUGACUGCCUGGAUUACCCUCGGACAUAU  
AACCUUGUAGCACGCUGUUGCUGUAUAGGUGACCAACGCCACUCGAGUAGACCAGC  
UCUCUUAAGUCCGGACAAUGAUAGGAGGGCGCGGUCAAUCUACUUCUGGCUAGUUAAG  
AAUAGGCUGCACCCGACCUCUAUAAGUAGCGUGUCCUCUAGAGCUACGCAGGUUCGC  
AAUAAAAGCGUUGAUUAGUGUGCAUAGAACAGACCUCUUAUUCGGUGAAACGCCAG  
AAUGCUAAAUUCCAAUAACUCUUCUCCAAAACGCGUACGGCCGAAGACGCGCGCUUAU  
CUUGUGUACGUUCUCGCACAUGGAAGAAUCAGCGGGCAUGGUGGUAGGGCAAUAG  
GGGAGCUGGGUAGCAGCGAAAAAGGGCCCCUGCGCACGUAGCUUCGCUUUCGUCU  
GAAACAACCCGGCAUCCGUUGUAGCGAUCCCGUUAUCAGUGUUAUUCUUGUGCGCA  
CUAAGAUUCAUGGUGUAGUCGACAAUAACAGCGUCUUGGCAGAUUCUGGUCACGUG  
CCCUAUGCCCCGGGCUUGUGCCUCUCAGGUGCACAGCGAUACUUAAGCCUUAAGG  
UACUCGACGUGGGUACCGAUUCGUGACACUUCUUAAGAUUAUUCACUGUGUUAAGC  
CCCGCACCGCCGACCUAACUGGUCCAUGUAUACGCAUUCGCUAGAGCGGAUCGAUA  
AUAAAAGCUUGAAUU (SEQ ID NO: 122)

GGGAGAAAGCUCAAGCUUAUCCAAGUAGGCUGGUCACCUAGUACAACGUAGCCGGUA  
UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGACCGUCUCAAGGUCCAAGUUAGUCUGCCUAUA  
AAGGUGCGGAUCCACAGCUGAUGAAAGACUUGUGCGGUACGGUUAUUCUCCCUUU  
UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUAGUAAAUGCGUCUACUGAAUCCAGCGAUGAUGCUGGC  
CCAGAUC (SEQ ID NO: 123)

GGGAGAAAGCUCAAGCUUAUCCAAGUAGGCUGGUCACCUAGUACAACGUAGCCGGUA  
UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGACCGUCUCAAGGUCCAAGUUAGUCUGCCUAUA  
AAGGUGCGGAUCCACAGCUGAUGAAAGACUUGUGCGGUACGGUUAUUCUCCCUUU  
UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUAGUAAAUGCGUCUACUGAAUCCAGCGAUGAUGCUGGC  
CCAGAUCUUCGACCACAAGUGCAUAUAGUAGUCAUCGAGGGUCGCCUUUUUUUUUUUU  
UUUUUUUUUUUUUUUGGCCAGUUCUGAGACUUCGCUAGAGACUACAGUUACAGCUG  
CAGUAGUAACCACUGCGGCUAUUGCAGGAAUCCCGUUCAGGUUUUUUUUUUUUUUU  
UUUUUUUUUCCGCUCACUAUGAUUAAGAACCAGGUGGAGUGACUGCUCUCGAGG  
UCUCACGAGAGCGCUCGAUACAGUCCUUGGAAGAAUCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU  
UUUUUGUGCGACGAUCACAGAGAACUUCUAUUAUGCAGGUCUGCUCUA (R 722 SEQ  
ID NO: 124)

GGGAGAAAGCUCAAGCUUAUCCAAGUAGGCUGGUCACCGUACAACGUAGCCGGUA  
 UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGACCGUCUCAAGGUCCAAGUUAGUCUGCCUAUA  
 AAGGUGCGGAUCCACAGCUGAUGAAAGACUUGUGCGGUACGGUUAUCUCCCUUU  
 UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUAGUAAAUGCGUCUACUGAAUCCAGCGAUGAUGCUGGC  
 CCAGAUCUUCGACCACAAGUGCAUAUAGUAGUCAUCGAGGGUCCUUUUUUUUUUUU  
 UUUUUUUUUUUUUUGGCCAGUUCUGAGACUUCGCUAGAGACUACAGUUACAGCUG  
 CAGUAGUAACCACUGCGGCUAUUGCAGGAAAUCCCGUUCAGGUUUUUUUUUUUUUUU  
 UUUUUUUUCCGCUCACUAUGAUUAAGAACCAGGUGGAGUGUCACUGCUCUCGAGG  
 UCUCACGAGAGCGCUCGAUACAGUCCUUGGAAGAAUCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU  
 UUUUGUGCGACGAUCACAGAGAAUCUUAUUCUUAUGCAGGUCUGCUCUAGAACGAAC  
 UGACCUGACGCCUGAACUUAUGAGCGUGCGUAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU  
 UCCUCCCAACAAAUGUCGAUCAAUAGCUGGGCUGUUGGAGACGCGUCAGCAAUUGCC  
 GUGGCUCCAUAAGGACGUGUAGACUUCUAAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU  
 GACCACAAUAAUUAUCUUGCUUGGUUGGGCGCAAGGGCCCGUAUCAGGUCAUAA  
 ACGGGUACAUGUUGCACAGGCUCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCGCUGAG  
 UUAUUCGCGUCUAAAAGACGGCAGACGUCAGUCGACAACACGGUCUAAAGCAGUGC  
 UACAUCUGCCGUGUUCGUGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGUGAACCUACACGGC  
 GUGCACUGUAGUUCGCAAUUCAUAGGGUACCGGCUCAGAGUUAUGCCUUGGUUGA  
 AACUGCCCAGCAUACUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCAUAUCCCAUGCUAAGCAA  
 GGAUGCCGCGAGUCAUGUUAAGCUUGAAUU (SEQ ID NO: 125)

De acuerdo con otra realización particularmente preferente, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (VI), que es un ADN o un ARN, puede seleccionarse de por ejemplo cualquiera de las siguientes secuencias:

UAGCGAAGCUCUUGGACCUACCUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCUGCGUCCUAGAAGUA  
 CACG (SEQ ID NO: 126)

5

o  
 UAGCGAAGCUCUUGGACCUACCUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCUGCGUCCUAGAAGU  
 ACACGAUCGCUUCGAGAACCUGGAUGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGACGCAAGGAUCU  
 UCAUGUGC (SEQ ID NO: 127)

En otra realización preferente, la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico aquí definido, que es un ADN o un ARN, también se puede presentar en forma de un ácido nucleico modificado.

10

De acuerdo con otro aspecto, la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico aquí definido, que es un ADN o un ARN, puede proporcionarse como un "ácido nucleico estabilizado", por ejemplo como un ARN o un ADN estabilizado, en especial como un ARN esencialmente resistente a degradación *in vivo* (por ejemplo por una exo- o una endo-nucleasa).

15

En este contexto, la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico aquí definido, que es un ADN o un ARN, puede contener modificaciones esqueléticas, modificaciones de azúcar o modificaciones de base. Una modificación del esqueleto en relación con la presente invención es una modificación donde los fosfatos del esqueleto nucleótido contenido en la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico se han modificado químicamente. Una modificación de azúcar en relación con la presente invención es una modificación química del azúcar de los nucleótidos de la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico. Además, una modificación de base en relación con la presente invención es una modificación química de la parte base de los nucleótidos de la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico.

20

De acuerdo con un aspecto más, la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico aquí definido, que es un ADN o un ARN, puede contener una modificación de lípidos.

25

El ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico como se define aquí, que es un ADN o un ARN, puede estar también en forma de un ácido nucleico modificado, donde cualquier modificación, como se define aquí, puede introducirse en el ácido nucleico. Modificaciones como las definidas aquí llevan preferentemente a un ácido nucleico estabilizado.

De acuerdo con un aspecto, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico como se define aquí, que es un ADN o un ARN, puede así proporcionarse como un "ácido nucleico estabilizado", de preferencia como un ARNm

estabilizado, en especial como un ARNm esencialmente resistente a degradación *in vivo* (por ejemplo, por una exo- o endo-nucleasa). Esta estabilización puede llevarse a cabo, por ejemplo, por un fosfato modificado en el cual los fosfatos del esqueleto nucleótido contenido en el ácido nucleico están modificados químicamente. El ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico puede además o alternativamente contener también modificaciones de azúcar o base. El ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico, particularmente cuando se proporciona como un ARNm, también puede también estabilizarse contra la degradación por ARNasas por la adición de la denominada estructura "cap5". Se da particular preferencia en este sentido a un m7G(5')ppp (5'(A,G(5')ppp(5')A o G(5')ppp(5')G como estructura "cap 5". De acuerdo con otro aspecto, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico puede contener, especialmente si el ácido nucleico está en forma de ARNm, una cola poli-A en el extremo 3', típicamente de alrededor de 10 a 200 nucleótidos adenosina, preferentemente alrededor de 10 a 100 nucleótidos adenosina, en especial alrededor de 20 a 100 nucleótidos adenosina o en particular alrededor de 40 a 80 nucleótidos adenosina. De acuerdo con otro aspecto, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico puede contener, especialmente si el ácido nucleico está en forma de ARNm, una cola poli-C en el extremo 3', típicamente de alrededor de 10 a 200 nucleótidos citosina, de preferencia alrededor de 10 a 100 nucleótidos citosina, muy preferiblemente alrededor de 20 a 70 nucleótidos citosina o todavía más preferiblemente alrededor de 20 a 60 o incluso 10 a 40 nucleótidos citosina. De acuerdo con otro aspecto, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico puede estar modificado, y así estabilizado, especialmente si el ácido nucleico está en forma de ARNm, modificando el contenido G/C del ácido nucleico, particularmente un ARNm, en particular en la región de codificación del mismo.

En un aspecto particularmente preferido de la presente invención, el contenido G/C de la región de codificación del ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico, especialmente si el ácido nucleico está en forma de ARNm, está modificado, particularmente incrementado, en comparación con el contenido G/C de la región de codificación de su ARNm tipo silvestre particular, es decir, el ARNm no modificado. La secuencia de aminoácidos codificada del al menos un ARNm preferentemente no está modificada en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada del ARNm tipo silvestre particular. De preferencia, el contenido G/C de la región de codificación del ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico, especialmente si el ácido nucleico está en forma de ARNm, se incrementa en al menos un 7%, muy preferiblemente en al menos un 15%, en particular en al menos un 20%, en comparación con el contenido G/C de la región codificada del ARNm tipo silvestre que codifica para un antígeno, una proteína antigénica o un péptido antigénico como se define aquí o su fragmento o variante del mismo. De acuerdo con una realización específica, al menos el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, muy preferiblemente al menos el 70%, todavía más preferiblemente al menos el 80% y más preferiblemente al menos el 90%, 95% o incluso el 100% de los codones sustituibles de la región de codificación para una proteína o péptido como se define aquí o su fragmento o variante del mismo o la secuencia completa de la secuencia de ARNm tipo silvestre son sustituidos, incrementando así el contenido G/C de dicha secuencia. En este contexto, es particularmente preferente aumentar el contenido G/C del ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico al máximo, especialmente si el ácido nucleico está en forma de ARN (es decir, el 100% de los codones sustituibles), en particular en la región que codifica para una proteína, en comparación con la secuencia tipo silvestre. Otra modificación preferente del ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico, especialmente si el ácido nucleico está en forma de ARNm, es que la región que codifica para la proteína adyuvante se modifica en comparación con la región correspondiente del ARNm tipo silvestre de forma que al menos un codón de la secuencia tipo silvestre que codifica para un ARNt que es relativamente raro en la célula se cambia por un codón que codifique para un ARNt que es relativamente frecuente en la célula y porta el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro. Con esta modificación, las secuencias del ácido nucleico, especialmente si el ácido nucleico está en forma de ARNm, se modifican de manera que se insertan codones para los que los ARNt que ocurren frecuentemente están disponibles. En otras palabras, mediante esta modificación todos los codones de la secuencia tipo silvestre que codifican para un ARNt que es relativamente raro en la célula pueden en cada caso cambiarse por un codón que codifique para un ARNt que es relativamente frecuente en la célula y el cual, en cada caso, porta el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro.

Qué moléculas de ARNt se presentan de manera relativamente frecuente en la célula y cuáles, por el contrario, ocurren de manera relativamente rara es conocido del experto en la técnica; véase, por ejemplo, Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11(6):660-666. Son particularmente preferentes los codones que usan, para el aminoácido particular, el ARNt que se presenta más frecuentemente, por ejemplo el codón Gly que usa el ARNt que se presenta más frecuentemente en la célula (humana).

Las moléculas de ácido nucleico usadas de acuerdo con la presente invención como se define aquí pueden prepararse usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo métodos sintéticos, por ejemplo síntesis en fase sólida, así como métodos *in vitro*, tales como reacciones de transcripción *in vitro* o reacciones *in vivo*, como propagación *in vivo* de plásmidos de ADN en bacterias.

De acuerdo con otra realización particularmente preferente, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico, especialmente si el ácido nucleico está en forma de un ácido nucleico de codificación, de preferencia ARNm, puede alternativamente o además codificar para un péptido de señal secretor. Estos péptidos señal son secuencias que típicamente tienen una longitud de alrededor de 15 a 30 aminoácidos y se ubican preferentemente en el extremo N del péptido codificado, sin estar limitados a esto. Los péptidos señal como se definen aquí preferentemente permiten el transporte de la proteína o del péptido codificado por el ácido nucleico de la presente invención, especialmente si el ácido

nucleico está en forma de ARNm, dentro de un compartimiento celular definido, de preferencia la superficie celular, el retículo endoplásmico (ER) o el compartimiento endosómico-lisosómico.

5 Cualquiera de las modificaciones anteriores puede aplicarse al ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico, que es un ADN o un ARN, especialmente si el ácido nucleico está en forma de ARNm, y además a cualquier ácido nucleico como se usa aquí en el contexto de la presente invención, y, si es adecuado o necesario, pueden combinarse entre sí en cualquier combinación, siempre y cuando estas combinaciones de modificaciones no interfieran entre sí en el ácido nucleico respectivo. El experto en la técnica podrá adoptar esta opción correspondientemente.

10 Las proteínas o péptidos codificados por el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención como el aquí definido pueden comprender fragmentos o variantes de tales secuencias. Además, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico puede comprender fragmentos o variantes de estas secuencias de codificación. Estos fragmentos o variantes pueden comprender típicamente una secuencia que tenga una identidad de secuencia con una de las proteínas o péptidos o secuencias mencionados arriba de sus secuencias de ácido nucleico de codificación de al menos un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, de preferencia al menos 70%, muy preferiblemente al menos 80%, igualmente de manera preferente al menos 85%, en especial al menos 90% y con total preferencia al menos 95% o incluso 15 97%, con la secuencia tipo silvestre completa, ya sea a nivel de ácido nucleico o a nivel de aminoácidos.

20 Los "fragmentos" de proteínas o péptidos en el contexto de la presente invención pueden comprender una secuencia de una proteína o péptido como el aquí definido que, con respecto a su secuencia de aminoácidos (o su secuencia de ácido nucleico codificada), esté truncada en el extremo N, en el extremo C y/o entre secuencias en comparación con la secuencia de aminoácidos de la proteína original (nativa) (o su secuencia de ácido nucleico codificada). Este truncamiento puede así estar presente ya sea a nivel de aminoácido o correspondientemente al nivel de ácido nucleico. Una identidad de secuencia con respecto a este fragmento como se define aquí puede así preferentemente referirse a la proteína o péptido completo como se define aquí o a la secuencia de ácido nucleico (de codificación) completa de esta proteína o péptido. Lo mismo se aplica en consecuencia a los ácidos nucleicos.

25 Estos fragmentos de proteínas o péptidos en el contexto de la presente invención pueden comprender además una secuencia de una proteína o péptido como el aquí definido que tenga una longitud de alrededor 6 a aproximadamente 20 o incluso más aminoácidos, por ejemplo fragmentos procesados y presentados por moléculas MHC clase I, de preferencia con una longitud de alrededor de 8 a aproximadamente 10 aminoácidos, por ejemplo, 8, 9 ó 10 (o incluso 6, 7, 11 ó 12 aminoácidos), o fragmentos como los procesados y presentados por las moléculas MHC clase II, preferentemente de una longitud de alrededor de 13 o más aminoácidos, por ejemplo 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o incluso más aminoácidos, pudiendo seleccionarse estos fragmentos de cualquier parte de la secuencia de aminoácidos. Estos fragmentos son típicamente reconocidos por las células T en forma de un complejo que consiste en el fragmento de péptidos y una molécula MHC, es decir, los fragmentos típicamente no son reconocidos en su forma nativa.

35 Los fragmentos de proteínas o péptidos como los aquí definidos también pueden comprender epítomos de esas proteínas o péptidos. Epítomos (también llamados "determinantes de antígenos") en el contexto de la presente invención son típicamente fragmentos ubicados sobre la superficie exterior de proteínas o péptidos (nativos) como los aquí definidos, preferentemente de 5 a 15 aminoácidos, muy preferiblemente de 5 a 12 aminoácidos, en especial de 6 a 9 aminoácidos, que pueden ser reconocidos por anticuerpos o receptores de células B, es decir en su forma nativa. Estos epítomos de proteínas o péptidos pueden además seleccionarse de cualquiera de las variantes mencionadas aquí de estas proteínas o péptidos. En este contexto determinantes antigénicos pueden ser epítomos de conformación o discontinuos que estén compuestos de segmentos de las proteínas o péptidos como los aquí definidos que sean discontinuos en la secuencia de aminoácidos de las proteínas o péptidos como se definen aquí, pero que se junten en la estructura tridimensional o sean epítomos continuos o lineales que estén compuestos de una sola cadena de polipéptidos.

45 Las "variantes" de proteínas o péptidos como los aquí definidos pueden ser codificadas por el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico, donde se intercambian los nucleótidos del ácido nucleico que codifican para la proteína o péptido como el aquí definido. De esta manera, puede generarse una proteína o péptido que tenga una secuencia de aminoácidos que difiera de la secuencia original en una o más mutaciones, tales como uno o más aminoácidos sustituidos, insertados y/o suprimidos. De preferencia, estos fragmentos y/o variantes tienen la misma función biológica o actividad específica en comparación con la proteína nativa de longitud completa, por ejemplo su propiedad antigénica específica.

50 También está dentro del alcance de la invención si las nanopartículas (= complejos de carga de portadores poliméricos) de origen diferente (por ejemplo, que difieren en el tipo de portador polimérico y/o ácido nucleico) están embebidas juntas en un recubrimiento de polímero biodegradable.

De acuerdo con la presente invención, la nanopartícula que comprende o consiste en un complejo de un ácido nucleico y una molécula portadora polimérica como se define aquí está recubierta con un polímero biodegradable, siendo el polímero biodegradable un polímero de PLGA.

De acuerdo con las realizaciones reivindicadas y no reivindicadas aquí descritas los polímeros (por ejemplo biodegradables) se utilizan para revestir el ácido nucleico comprendiendo nanopartículas (= complejos de carga de portadores poliméricos). Estos polímeros (biodegradables) se pueden seleccionar de todos los polímeros (biodegradables) conocidos en la técnica para tal fin. Son particularmente preferentes aquellos polímeros (biodegradables) que son insolubles en agua, pero que son solubles en disolventes orgánicos, en particular en disolventes orgánicos como etanol, acetona y/o THF. Particularmente preferentes en este contexto son poliésteres (por ejemplo, ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA)), copolímeros (por ejemplo ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), con diferentes proporciones de ácido láctico y ácido glicólico), poliamidas, lactamas (por ejemplo caprolactama), poliéteres, etc. De acuerdo con una realización no reivindicada, el polímero no es necesariamente biodegradable. Sin embargo, para las aplicaciones médicas contempladas aquí es ventajoso si el polímero es biodegradable.

En este contexto, se prefieren particularmente polímeros de PLGA con un peso molecular promedio en el intervalo de 4 kDa-210 kDa, más preferiblemente en el intervalo de 10 kDa a 110 kDa, incluso más preferiblemente en el intervalo de 20 kDa a 80kDa. La proporción de ácido láctico en el polímero de PLGA está preferiblemente en el intervalo de 25 a 100%, más preferiblemente en el intervalo de 25 a 85%. Las nanopartículas también pueden recubrirse con mezclas de dos o más polímeros diferentes (biodegradables). Así, cuando en este documento se hace referencia al recubrimiento con un polímero "biodegradable", este recubrimiento no está necesariamente, pero preferiblemente, se limita a un solo tipo de polímero (biodegradable).

También se entiende que preferiblemente el recubrimiento con el polímero (biodegradable) es un recubrimiento directo de las nanopartículas, es decir, las nanopartículas no están separadas del polímero (biodegradable) por un recubrimiento o recubrimientos intermedios adicionales, sino que están en contacto directo con el polímero (biodegradable). Como se usa aquí, "recubierto con un polímero (biodegradable)" se refiere a una situación en la que las nanopartículas individuales están recubiertas por una capa de polímero (biodegradable), así como a situaciones en las que una pluralidad de nanopartículas está embebida (por ejemplo distribuidas de manera uniforme o desigual) en una composición de polímero (biodegradable).

Según una realización adicional, la presente invención también proporciona una composición (farmacéutica) que comprende el ácido nucleico de la invención que comprende nanopartículas recubiertas con un polímero biodegradable como se define aquí y opcionalmente un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como un primer ingrediente, la composición farmacéutica comprende el (ácido nucleico comprendiendo) nanopartículas revestidas con un polímero biodegradable tal como se define aquí.

Como un segundo ingrediente la composición farmacéutica inventiva puede comprender al menos un agente farmacéuticamente activo adicional. Un componente farmacéuticamente activo a este respecto es un compuesto que tiene un efecto terapéutico para sanar, mitigar o prevenir una indicación particular, preferentemente enfermedades cancerosas, enfermedades autoinmunes, alergias o enfermedades infecciosas. Estos compuestos incluyen péptidos o proteínas, preferentemente como los aquí definidos para codificar ácidos nucleicos, ácidos nucleicos, de preferencia como los aquí definidos, compuestos orgánicos o inorgánicos de bajo peso molecular (terapéuticamente activos) (peso molecular inferior a 5.000, de preferencia inferior a 1.000), azúcares, antígenos o anticuerpos, de preferencia como los aquí definidos, agentes terapéuticos ya conocidos en la técnica anterior, células antigénicas, fragmentos celulares antigénicos, fracciones celulares; componentes de pared celular (por ejemplo polisacáridos), patógenos modificados, atenuados o desactivados (por ejemplo químicamente o por irradiación) (virus, bacterias, etc.), adyuvantes, preferentemente como los aquí definidos, etc.

Además, la composición farmacéutica inventiva puede comprender un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. En el contexto de la presente invención, un portador farmacéuticamente aceptable incluye típicamente la base líquida o no líquida de la composición farmacéutica. Si la composición farmacéutica inventiva se proporciona en forma líquida, el portador será típicamente agua libre de pirógenos; solución salina isotónica o soluciones tampón (acuosas), por ejemplo tampón fosfato, citrato, etc. Particularmente para la inyección de la composición farmacéutica inventiva, puede emplearse agua o de preferencia un tampón, en especial un tampón acuoso, que contenga una sal sódica, preferentemente al menos 50 mM de una sal sódica, una sal de calcio, de preferencia al menos 0,01 mM de una sal de calcio, y opcionalmente una sal de potasio, de preferencia al menos 3 mM de una sal de potasio. De acuerdo con una realización preferente, las sales de sodio, calcio y opcionalmente potasio pueden estar presentes en forma de sus haluros, por ejemplo cloruros, yoduros o bromuros, en forma de sus hidróxidos, carbonatos, carbonatos ácidos o sulfatos. Sin limitación, ejemplos de sales de sodio incluyen, por ejemplo, NaCl, NaI, NaBr, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ejemplos de sales de potasio opcionales incluyen, por ejemplo, KCl, KI, KBr, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KHCO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y ejemplos de sales de calcio incluyen, por ejemplo, CaCl<sub>2</sub>, CaI<sub>2</sub>, CaBr<sub>2</sub>, CaCO<sub>3</sub>, CaSO<sub>4</sub>, Ca(OH)<sub>2</sub>. Además, en el tampón pueden estar incluidos los aniones orgánicos de los cationes mencionados arriba. De acuerdo con una realización especialmente preferente, el tampón adecuado para propósitos de inyección como se define aquí puede contener sales seleccionadas de entre cloruro de sodio (NaCl), cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) y opcionalmente cloruro de potasio (KCl), donde pueden estar presentes, además de los cloruros, aniones adicionales. El CaCl<sub>2</sub> también puede reemplazarse por otra sal, como KCl. Típicamente, las sales del tampón de inyección están presentes a una concentración de al menos 50 mM de cloruro de sodio (NaCl),



al menos 3 mM de cloruro de potasio (KCl) y al menos 0,01 mM de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>). El tampón de inyección puede ser hipertónico, isotónico o hipotónico en relación al medio de referencia específico, es decir el tampón puede tener un contenido en sales más alto, idéntico o más bajo que el medio de referencia específico, donde preferentemente se emplean las concentraciones de las sales mencionadas arriba, que no provocan un daño celular debido a ósmosis o a otros efectos de la concentración. Medios de referencia son, por ejemplo, líquidos que se presentan en métodos “*in vivo*”, tales como sangre, linfa, líquidos citosólicos u otros líquidos corporales, o por ejemplo líquidos que se pueden usar como medios de referencia en métodos “*in vitro*”, tales como tampones o líquidos comunes. Estos tampones o líquidos comunes son conocidos del experto. La Solución Ringer-lactato es particularmente preferente como base líquida.

De acuerdo con otro aspecto, la composición farmacéutica inventiva puede comprender un adyuvante. En este contexto, un adyuvante puede entenderse como cualquier compuesto que es adecuado para iniciar o incrementar una respuesta inmune del sistema inmunológico innato, es decir una respuesta inmune no específica. En otras palabras, cuando se administra, la composición farmacéutica inventiva provoca típicamente una respuesta inmune innata debido al adyuvante contenido opcionalmente en la misma. Este adyuvante puede seleccionarse de cualquier adyuvante conocido por el experto y adecuado para el presente caso, esto es apoyar la inducción de una respuesta inmune innata en un mamífero.

La composición farmacéutica de la invención puede administrarse vía oral, parenteral, por espray de inhalación, vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o por medio de un depósito implantado. El término parenteral según se usa aquí incluye técnicas de inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional, intracranial, transdérmica, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, intracardiaca, intraarterial y sublingual o técnicas de infusión.

La composición farmacéutica de la invención puede usarse para propósitos médicos humanos y también veterinarios, de preferencia para propósitos médicos humanos, como una composición farmacéutica en general o como una vacuna.

De acuerdo con un aspecto preferente particular, la composición farmacéutica inventiva puede proporcionarse o usarse como un agente inmunoestimulador. En este contexto, la composición farmacéutica de la invención es de preferencia como la definida arriba. Muy preferiblemente, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico, preferentemente contenido en la composición farmacéutica, es típicamente un ácido nucleico inmunoestimulador como se define aquí, por ejemplo un CpG-ADN o un ARN inmunoestimulador (ARNis). Alternativa o adicionalmente, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico, preferentemente contenido en la composición farmacéutica, es un ácido nucleico de codificación como el definido aquí, de preferencia un ADNc o un ARNm, muy preferiblemente que codifica para una proteína adyuvante preferentemente como se define aquí.

En un aspecto específico de esta realización, en este contexto es preferente que una proteína adyuvante sea un componente del portador polimérico, preferiblemente como componente (AA)<sub>x</sub>.

De acuerdo con un aspecto especialmente preferente, la composición farmacéutica inventiva (o el complejo de carga portador polimérico de la invención que comprende nanopartículas revestidas con un polímero biodegradable para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada de medicamentos) puede proporcionarse o usarse como un adyuvante. En este contexto, el adyuvante preferentemente se define como la composición farmacéutica de la invención anterior. En especial, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico, contenido preferentemente en el adyuvante, es típicamente un ácido nucleico inmunoestimulador como el aquí definido, por ejemplo un CpG-ADN o un ARN inmunoestimulador (ARNis). Alternativa o adicionalmente, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico, preferentemente contenido en el adyuvante, es un ácido nucleico de codificación como el aquí definido, de preferencia un ADNc o un ARNm, que codifica muy preferiblemente para una proteína adyuvante, de preferencia como la aquí definida. El ácido nucleico de la invención que comprende nanopartículas recubiertas con un polímero (biodegradable) para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada del fármaco, preferiblemente contenido en el adyuvante, inicia típicamente una respuesta inmune innata en el paciente a tratar. Este adyuvante puede utilizarse en cualquier terapia acompañante, con cualquier vacuna conocida o con cualquier agente terapéutico (conocido) adicional, de preferencia antes de, junto con o después de la administración de la terapia principal, antes de, junto con o después de la administración de una vacuna (conocida) adicional o de un agente terapéutico adicional (conocido).

El ácido nucleico de la invención que comprende nanopartículas recubiertas con un polímero biodegradable para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada de fármacos o la composición farmacéutica de la invención, como se definen aquí, proporcionados o usados como adyuvante preferentemente son capaces de desencadenar una reacción inmune (innata) no específica de antígeno (como se proporciona por el sistema inmunológico innato), de preferencia de una manera inmunoestimuladora. En general, una reacción inmune puede provocarse de varias maneras. Un factor importante para una respuesta inmune adecuada es la estimulación de diferentes subpoblaciones de células T. Los linfocitos T se diferencian típicamente en dos subpoblaciones, las células T auxiliares 1 (Th1) y las células T auxiliares 2 (Th2), con las cuales el sistema inmunológico es capaz de destruir patógenos intracelulares (Th1) y extracelulares (Th2) (por ejemplo, antígenos). Las dos poblaciones de células Th difieren en el patrón de proteínas efectoras (citoquinas) producidas por ellas. Así, las células Th1 asisten en la respuesta inmune celular mediante activación de macrófagos y células T citotóxicas. Las células Th2, por otro lado, promueven la respuesta inmune humoral mediante la estimulación

de células B para su conversión en células plasmáticas y mediante la formación de anticuerpos (por ejemplo, contra antígenos). La relación Th1/Th2 es por tanto de gran importancia en la respuesta inmune. En relación con la presente invención, la relación Th1/Th2 de la respuesta inmune está desplazada preferentemente por el agente inmunoestimulador, esto es el ácido nucleico de la invención que comprende nanopartículas recubiertas con un polímero biodegradable para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada de fármacos, en la dirección hacia la respuesta celular, es decir la respuesta Th1, e induciendo así una respuesta inmune predominantemente celular. Como se definió arriba, el ácido nucleico de la invención que comprende nanopartículas recubiertas con un polímero biodegradable para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada de fármacos ejerce por sí solo una respuesta inmune innata inespecífica, lo cual permite al ácido nucleico de la invención que comprende nanopartículas recubiertas con un polímero biodegradable para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada de fármacos ser usado tal cual (sin añadir otro componente farmacéuticamente activo) como agente inmunoestimulador. Si se administra junto con otro componente farmacéuticamente activo, de preferencia un componente específicamente inmunogénico, en especial un antígeno, el ácido nucleico comprendido en el ácido nucleico de la invención que comprende nanopartículas recubiertas con un polímero biodegradable para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada de fármacos sirve como un adyuvante que apoya la respuesta inmune adaptiva específica provocada por el otro componente farmacéuticamente activo, por ejemplo un antígeno.

De acuerdo con otra realización particularmente preferente, la composición farmacéutica inventiva (o el ácido nucleico de la invención que comprende nanopartículas recubiertas con un polímero biodegradable para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada de fármacos) puede proporcionarse o usarse como una vacuna.

Esta vacuna de la invención está compuesta típicamente al igual que la composición farmacéutica inventiva y preferentemente apoya o provoca una respuesta inmune del sistema inmunológico de un paciente a tratar, por ejemplo una respuesta inmune innata, cuando se usa un ARN o un ARNm como la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico formado por la carga de ácido nucleico y una molécula portadora polimérica de acuerdo con la fórmula genérica (I) o (Ia) o de acuerdo con cualquier sub-fórmula de la misma como las aquí definidas. Además o alternativamente, la vacuna puede provocar una respuesta inmune adaptiva, preferentemente cuando el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico formado por la carga de ácido nucleico y una molécula portadora polimérica de acuerdo con la fórmula genérica (I) o (Ia) o de acuerdo con cualquier sub-fórmula de las mismas como las aquí definidas codifica para cualquiera de los antígenos o proteínas mencionados arriba, que provocan una respuesta inmune adaptiva.

En este contexto, la vacuna se define preferiblemente como un adyuvante o como una composición farmacéutica inventiva como la descrita arriba. En especial, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico contenido en esa vacuna puede ser cualquier ácido nucleico como el definido arriba, de preferencia un ácido nucleico inmunoestimulador como el aquí definido, por ejemplo un CpG-ADN o un ARN inmunoestimulador (ARNis). Alternativa o adicionalmente, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico preferentemente contenido en la vacuna es un ácido nucleico de codificación como el aquí definido, preferiblemente un ADNc o un ARNm, en especial que codifica para una proteína adyuvante, de preferencia como la aquí definida. Alternativa o adicionalmente, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico contenido preferentemente en la vacuna es un ácido nucleico de codificación como el aquí definido, preferiblemente un ADNc o un ARNm, muy preferiblemente que codifica para un antígeno, de preferencia como el aquí definido. En particular, cuando el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico no codifica para un antígeno, la vacuna de la invención puede contener un antígeno, de preferencia como el definido arriba, como una proteína o péptido o codificado con un ácido nucleico, o células antigénicas, o fragmentos celulares antigénicos, fracciones celulares; componentes de pared celular (por ejemplo polisacáridos), patógenos patógenos (por ejemplo virus, bacterias) modificados, atenuados o desactivados (por ejemplo químicamente o por irradiación).

De acuerdo con otro aspecto, la vacuna de la invención puede contener un péptido o antígeno de proteína como componente (AA)<sub>x</sub> del portador polimérico como el definido aquí, de preferencia como parte del componente repetitivo [S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub>.

La vacuna de la invención también puede comprender un portador, adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable como el aquí definido para la composición farmacéutica inventiva.

La vacuna de la invención puede contener además una o más sustancias auxiliares para incrementar así su inmunogenicidad, si se desea. De esta manera, preferentemente se logra una acción sinérgica del ácido nucleico de la invención que comprende nanopartículas recubiertas con un polímero biodegradable para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada de fármacos formado por el revestimiento polimérico, la carga de ácido nucleico y la molécula portadora polimérica de acuerdo con la fórmula genérica (I) o (Ia) o según cualquier sub-fórmula de la misma como las aquí definidas y una sustancia auxiliar, que puede estar contenida opcionalmente en la vacuna de la invención aquí definida. Dependiendo de los diferentes tipos de sustancias auxiliares, varios mecanismos pueden entrar en consideración a este respecto. Por ejemplo, los compuestos que permitan la maduración de células dendríticas (DCs), por ejemplo, lipopolisacáridos, TNF-alfa o ligando CD40, forman una primera clase de sustancias auxiliares adecuadas. En general, es posible usar como sustancia auxiliar cualquier agente que influya en el sistema inmunológico a la manera de una "señal de peligro" (LPS, GP96, etc.) o citoquinas, tales como GM-CSF, que permitan incrementar una respuesta inmune y/o

5 influenciarla de una manera seleccionada. Las sustancias auxiliares particularmente preferentes son citoquinas, tales como monoquinas, linfoquinas, interleucinas o quimioquinas, que promueven además la respuesta inmune innata, tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, INF-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-beta o TNF-alfa, factores de crecimiento, tales como hGH.

Aditivos adicionales que pueden estar incluidos en la vacuna de la invención son emulsionantes, tales como Tween®; agentes humectantes, por ejemplo laurilsulfato de sodio; agentes colorantes; agentes saborizantes, vehículos farmacéuticos; agentes formadores de tabletas; estabilizadores; antioxidantes y conservantes.

10 La vacuna de la invención también puede contener, alternativa o adicionalmente, cualquier compuesto adicional conocido por ser inmunoestimulador gracias a su afinidad de unión (como ligandos) a los receptores tipo Toll humanos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, o gracias a su afinidad de unión (como ligandos) a los receptores tipo Toll de murino TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13.

15 Otra clase de compuestos que pueden ser añadidos a la vacuna de la invención en este contexto pueden ser ácidos nucleicos CpG, en particular CpG-ARN o CpG-ADN. Un CpG-ARN o CpG-ADN puede ser un CpG-ADN de hebra individual (ss CpG-ADN), un CpG-ADN de doble hebra (ADNds), un CpG-ARN de una sola hebra (ss CpG-ARN) o un CpG-ARN de doble hebra (ds CpG-ARN). El ácido nucleico CpG está de preferencia en forma de CpG-ARN, muy preferiblemente en forma de CpG-ARN de una sola hebra (ss CpG-ARN). Preferentemente, el ácido nucleico CpG contiene al menos una o más secuencias de dinucleótidos de citosina/guanina (mitogénicas) (motivos CpG). De acuerdo con una primera alternativa preferida, al menos un motivo CpG contenido en estas secuencias, es decir la C (citosina) y la G (guanina) del motivo CpG, no está metilado. Todas las citosinas o guaninas adicionales contenidas opcionalmente en estas secuencias pueden estar metiladas o no metiladas. De acuerdo con una alternativa preferida adicional, sin embargo, la C (citosina) y la G (guanina) del motivo CpG también puede estar presente en forma metilada.

25 La vacuna inventiva también puede contener, alternativa o adicionalmente, un ARN inmunoestimulador, es decir un ARN derivado de un ARN inmunoestimulador que desencadene o incremente una respuesta inmune (innata). De preferencia, este ARN puede ser en general como el aquí definido para las moléculas de ARN. En este contexto, las clases de moléculas de ARN que pueden inducir una respuesta inmune innata pueden seleccionarse, por ejemplo, de ligandos de los receptores tipo Toll (TLR), particularmente de secuencias de ARN que representen y/o codifiquen para ligandos de TLR, seleccionados preferiblemente de miembros de la familia humana TLR1-TLR10 o miembros de la familia murina TLR1-TLR13, muy preferiblemente de TLR7 y TLR8, ligandos para receptores intracelulares para ARN (tales como RIG-1 o MDA-5, etc.) (véase, por ejemplo, Meylan, E., Tschopp, J. (2006). Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. Mol. Cell 22, 561-569), o cualquier otra secuencia de ARN inmunoestimuladora. Este ARN inmunoestimulador puede comprender una longitud de 1.000 a 5.000, de 500 a 5.000, de 5 a 5.000 o de 5 a 1.000, 5 a 500, 5 a 250, de 5 a 100, de 5 a 50 o de 5 a 30 nucleótidos.

35 La presente invención proporciona como una realización dispositivos médicos o de diagnóstico que presentan un revestimiento, comprendiendo el revestimiento las citadas nanopartículas embebidas en un polímero biodegradable.

40 En este contexto, los dispositivos médicos se definen como todos los dispositivos o implantes utilizados con fines médicos en o sobre un paciente. En general, un dispositivo médico es un producto que se utiliza con fines médicos en pacientes, en el diagnóstico, la terapia o la cirugía. Dichos dispositivos médicos o implantes se pueden seleccionar entre: articulaciones artificiales (cadera, rodilla, etc.), válvulas cardíacas artificiales, ano artificial, dispositivos para reparar huesos rotos, etc., pero particularmente preferentes en este contexto son stents coronarios y todos los dispositivos médicos para aplicaciones (intra)vasculares, como catéteres de balón, prótesis vasculares, bobinas, etc.

Adicionalmente, son preferentes todo tipo de parches, parches coronarios o vasculares.

45 Los dispositivos de diagnóstico incluyen todos los dispositivos que presentan herramientas de investigación que pueden usarse en el contexto de la transfección de células con ácidos nucleicos. Particularmente preferente en este contexto son los utensilios de plástico empleados para el cultivo celular, por ejemplo placas de cultivo celular, o artículos de vidrio, por ejemplo soportes de vidrio.

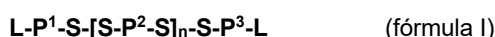
También se describe aquí el uso de un polímero (biodegradable) para recubrir un complejo de carga de portador polimérico (es decir, nanopartículas) como se define aquí para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada.

50 También se describe aquí el uso de un polímero (biodegradable) para recubrir un complejo de carga de portador polimérico (es decir, nanopartículas) como se define aquí en dispositivos médicos o de diagnóstico para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada.

La presente descripción también proporciona un método para preparar el ácido nucleico de la invención que comprende nanopartículas revestidas con un polímero (biodegradable), por ejemplo para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada, y un método para proporcionar dispositivos o implantes médicos o de diagnóstico con un recubrimiento que comprende un polímero (biodegradable) con el ácido nucleico que comprende nanopartículas embebidas en el mismo. Preferiblemente, el método se lleva a cabo para la inmovilización reversible y/o la liberación del fármaco de dicha(s) nanopartícula(s) en dichos dispositivos o implantes médicos o de diagnóstico. La descripción también comprende el producto obtenido u obtenible por tales métodos (producto por proceso).

El método de la invención para preparar las nanopartículas revestidas de la invención comprende preferiblemente los siguientes pasos:

- 10 a) proporcionar una nanopartícula que comprende o consiste en un complejo de un ácido nucleico, que es ADN o ARN, una molécula portadora polimérica de acuerdo con la fórmula genérica (I):



donde

15  $P^1$  y  $P^3$  son iguales o diferentes entre sí y representan una cadena polimérica hidrófila lineal o ramificada, presentando cada  $P^1$  y  $P^3$  al menos una porción -SH capaz de formar un enlace disulfuro después de la condensación con el componente  $P^2$ , seleccionándose la cadena polimérica hidrófila ramificada o lineal, independientemente, de entre polietilenglicol (PEG), poli-N-(2-hidroxiopropil)metacrilamida, poli-2-(metacrililoxi)etilfosforilcolinas, poli(hidroxiálquil-L-asparagina), poli-(2-(metacrililoxi)etil-fosforilcolina), hidroxietilalmidón o poli(hidroxiálquil-L-glutamina), donde la cadena polimérica hidrófila tiene un peso molecular de aproximadamente 1 kDa a aprox. 100 kDa,

20  $P^2$  es un péptido o proteína catiónico o policatiónico, preferentemente de una longitud de aproximadamente 3 a 100 aminoácidos, o es un polímero catiónico o policatiónico con un peso molecular de 0,5 kDa a 30 kDa, presentando cada  $P^2$  al menos dos porciones -SH capaces de formar un enlace disulfuro después de la condensación con otros componentes  $P^2$  o componente(s)  $P^1$  y/o  $P^3$ ,

25 -S-S- es un enlace (reversible) disulfuro,

30 L es un ligando opcional, que puede estar presente o no, y se puede seleccionar, independientemente, de entre RGD, transferrina, folato, un péptido señal o una secuencia de señal, una señal o secuencia de localización, una señal o secuencia de localización nuclear (NLS), un anticuerpo, un péptido de penetración celular, TAT, un ligando de un receptor, citoquinas, hormonas, factores de crecimiento, moléculas pequeñas, carbohidratos, manosa, galactosa, ligandos sintéticos, agonistas de moléculas pequeñas, inhibidores o antagonistas de receptores o análogos de peptidomimético RGD, y

n es un entero seleccionado de un intervalo de 1 a 50, preferiblemente en un intervalo de 1, 2, 3, 4 o 5 a 10, con mayor preferencia en un intervalo de 1, 2, 3 o 4 a 9, y

- 35 b) poner en contacto, preferiblemente mezclando, la nanopartícula de a) con un polímero de PLGA biodegradable en una solución que contiene un disolvente orgánico, y

- c) opcionalmente eliminando, por ejemplo mediante secado, el disolvente orgánico y, cuando sea apropiado, cualquier otro disolvente de la solución que contiene disolvente orgánico.

40 Existen varias formas posibles para llevar a cabo dicho método. Las nanopartículas se pueden proporcionar sin disolvente (por ejemplo, liofilizadas) o en solución, por ejemplo en agua o en una solución que contiene un disolvente orgánico. Las nanopartículas pueden ponerse en contacto con el polímero (biodegradable). Para este propósito, el polímero ya puede estar disuelto en una solución que contiene un disolvente orgánico (preferiblemente 100% de disolvente orgánico) y luego las nanopartículas secas se disuelven en dicha solución o la solución que contiene nanopartículas se mezcla con dicha solución de polímero (biodegradable). En la alternativa, las nanopartículas pueden estar presentes, por ejemplo, en una solución que contiene un disolvente orgánico (preferiblemente un 100% de disolvente orgánico) y el polímero (biodegradable) se disuelve luego en dicha solución que contiene un disolvente orgánico (siempre que el contenido de disolvente orgánico sea lo suficientemente alto para hacerlo). Igualmente, las nanopartículas y el polímero (biodegradable) pueden estar presentes en forma seca, luego se unen y posteriormente se agrega la solución que contiene el disolvente orgánico para disolver las nanopartículas y el polímero (biodegradable) en dicha solución.

50 En más detalle, el método para preparar las nanopartículas revestidas de la invención puede comprender preferiblemente los siguientes pasos:

1. Preparar el portador polimérico de acuerdo con la fórmula (I) (o cualquiera de sus subfórmulas):

- 5 a) proporcionando al menos una proteína o péptido catiónico o policatiónico como componente  $P^2$  como se define aquí y/o al menos un polímero catiónico o policatiónico como componente  $P^2$  como se define aquí, y opcionalmente al menos otro componente (por ejemplo  $(AA)_x$ ,  $[(AAx)]_z$ , etc.), de preferencia en las relaciones indicadas arriba por la fórmula (I), mezclar estos componentes, preferentemente en un medio básico como el aquí definido, preferiblemente en presencia de oxígeno o de otro iniciador como el aquí definido que lleve a condiciones de oxidación suave, de preferencia a un pH, una temperatura y un tiempo como los aquí definidos, y entonces condensado y así polimerizando estos componentes entre sí vía enlaces disulfuro (en una condensación de polimerización o policondensación) para obtener un componente repetitivo  $H-[S-P^2-S]_n-H$  o  $H\{[S-P^2-S]_a[S(AA)x-S]_b\}_nH$ , etc.;
- 10 b) proporcionar un polímero hidrófilo  $P^1$  y/o  $P^3$  como se define aquí, opcionalmente modificado con un ligando L y/o un componente aminoácido  $(AA)_x$  como el aquí definido;
- 15 c) mezclar el polímero hidrófilo  $P^1$  y/o  $P^3$  proporcionados en la etapa (b) con el componente repetitivo  $H-[S-P^2-S]_n-H$  o  $H\{[S-P^2-S]_a[S(AA)x-S]_b\}_nH$  obtenido de acuerdo con la etapa a) en una relación de alrededor de 2:1, (y entonces concluir típicamente la reacción de condensación por polimerización o de policondensación) y obtener el portador polimérico, preferentemente de acuerdo con la fórmula (I) como se define aquí o de acuerdo con cualquier sub-fórmula del mismo como se define aquí;
- d) opcionalmente purificar el portador polimérico inventivo obtenido de acuerdo con la etapa c), preferentemente empleando un método como el aquí definido.

20 2. Complejación del portador polimérico con la carga de ácido nucleico:

- a) añadir un ácido nucleico como el aquí definido al portador polimérico obtenido de acuerdo con la etapa 1c) o 1d), de preferencia en las relaciones indicadas arriba, y complejar el ácido nucleico con el portador polimérico obtenido de acuerdo con la etapa 1c) o 1d) para obtener el complejo de carga portador polimérico como se define aquí.

25 3. Opcionalmente liofilización del complejo de carga portador polimérico:

- a) Opcionalmente, el complejo de carga del portador polimérico obtenido en el paso 2 puede liofilizarse. Esto permite la reconstitución del ácido nucleico liofilizado que comprende nanopartículas en una solución que contiene un disolvente orgánico con un alto porcentaje de disolvente orgánico (preferiblemente el 100% de un disolvente orgánico).
- 30 b) Antes de recubrir con el polímero biodegradable, que es un polímero de PLGA, los complejos de carga del portador polimérico se reconstituyen en un disolvente, preferiblemente en una solución que contiene un disolvente orgánico como se define aquí.

4. Mezclar la solución resultante del paso 2 o 3 con el polímero biodegradable disuelto en una solución que contiene el disolvente orgánico como se define aquí.

35 5. Eliminación opcional, por ejemplo, secando, el disolvente orgánico (y/o cuando sea apropiado, cualquier otro disolvente en la solución resultante del paso 4).

40 Si los complejos de carga de portadores poliméricos se liofilizan, los complejos de carga de portadores poliméricos liofilizados se pueden reconstituir directamente en la solución que contiene disolvente orgánico comprendiendo el polímero biodegradable. Antes de mezclar con el polímero biodegradable disuelto en una solución que contiene disolvente orgánico, la solución resultante de los pasos 2 o 3, que comprende los complejos de carga portadores poliméricos se puede mezclar con/disolver en una solución que contiene disolvente orgánico.

45 El método descrito para proporcionar dispositivos o implantes médicos o de diagnóstico con un recubrimiento que comprende un polímero (biodegradable) con las nanopartículas (que comprenden ácido nucleico) embebidas en el mismo, por ejemplo para la inmovilización reversible y/o la liberación de fármaco de dicha(s) nanopartícula(s) en dichos dispositivos o implantes médicos o de diagnóstico, preferiblemente comprende los siguientes pasos:

- a) proporcionar una solución que contiene un disolvente orgánico que comprende disuelta en dicha solución i) nanopartículas que comprenden o consisten en un complejo de un ácido nucleico y una molécula portadora polimérica de acuerdo con la fórmula genérica (I) como se define aquí (complejo de carga portador polimérico), y ii) un polímero (biodegradable),

- b) aplicar la solución que contiene disolvente orgánico a, (por ejemplo la superficie de) el dispositivo médico o de diagnóstico o un implante como se define aquí; y
- c) eliminar opcionalmente, por ejemplo por secado, el disolvente orgánico (y/o cuando sea apropiado, cualquier otro disolvente).

5 En particular, dicho método puede comprender los siguientes pasos:

1. Preparar el vehículo polimérico de acuerdo con la fórmula (I) (o cualquiera de sus subfórmulas): como se definió anteriormente para el método de preparación del ácido nucleico de la invención que comprende nanopartículas recubiertas con un polímero (biodegradable) para la inmovilización reversible y/o la liberación de fármacos
- 10 2. Complejar el portador polimérico con la carga de ácido nucleico: como se definió anteriormente para el método de preparación del ácido nucleico de la invención que comprende nanopartículas recubiertas con un polímero (biodegradable) para la inmovilización reversible y/o la liberación de fármacos
3. Opcionalmente liofilizar el complejo de carga de portador polimérico: como se definió anteriormente para el método de preparación del ácido nucleico de la invención que comprende nanopartículas recubiertas con un polímero (biodegradable) para la inmovilización reversible y/o liberación de fármacos
- 15 4. Mezclar la solución resultante del paso 2 o 3 con el polímero (biodegradable) disuelto en una solución que contiene un disolvente orgánico como se define aquí. Si los complejos de carga de portadores poliméricos se liofilizaron, los complejos de carga de portadores poliméricos liofilizados se pueden reconstituir directamente en la solución que contiene disolvente orgánico comprendiendo el polímero (biodegradable).
- 20 5. Aplicar la solución resultante del paso 4 en un dispositivo médico o de diagnóstico o un implante como se define aquí, particularmente mediante recubrimiento por inmersión, secado por aspersion, recubrimiento por flujo o recubrimiento por rotación.
6. Opcionalmente eliminar, por ejemplo por secado, el disolvente orgánico (y/o cuando sea apropiado, cualquier otro disolvente).

25 El método para preparar el portador polimérico de acuerdo con la fórmula (I) como se define aquí representa una reacción de polimerización por condensación o de policondensación multi-etapa vía las partes -SH de los eductos, por ejemplo componente(s) P<sup>2</sup> como se definen aquí, otros componentes P<sup>1</sup> y/o P<sup>3</sup> y opcionalmente además componentes (AA)<sub>x</sub>. La reacción de polimerización por condensación o policondensación preferentemente conduce al portador polimérico como un polímero de condensación, donde los componentes individuales están enlazados por enlaces disulfuro. Esta polimerización de condensación lleva al portador polimérico de acuerdo con la fórmula (I) preparando en una primera

30 etapa 1a) de la reacción de condensación el componente repetitivo H-[S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub>-H o una variante del mismo como una especie de "núcleo" o "motivo central" del portador polimérico. En una segunda etapa 1b), se proporcionan los componentes P<sup>1</sup> y/o P<sup>3</sup>, que permiten terminar o de alguna manera "recubrir" el componente repetitivo H-[S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub>-H o una variante del mismo en una tercera etapa c) por adición de los componentes P<sup>1</sup> y/o P<sup>3</sup> como se definen aquí (opcionalmente modificados con un ligando L y/o con un componente aminoácido (AA)<sub>x</sub> como el aquí definido) al producto

35 de condensación obtenido de acuerdo con la etapa 1a). En la subsecuente etapa d), este producto puede ser purificado y usado además para complejar una carga de ácido nucleico como la aquí definida para obtener un complejo.

Es importante entender que el método de la invención se basa en una reacción de equilibrio bajo condiciones de oxidación suaves en las etapas 1a), 1b) y 1c) que, después de balancear el estado de equilibrio, permite obtener el portador polimérico de acuerdo con la fórmula (I) arriba o de acuerdo con cualquiera de sus sub-fórmulas comprendiendo los

40 componentes seleccionados en las relaciones molares deseadas. Para este propósito, se contemplan largos tiempos de reacción para lograr un estado de equilibrio en las etapas 1a), 1b) y 1c). Si por ejemplo una polimerización de condensación se va a llevar a cabo usando una relación molar de 5 componentes P<sup>2</sup> en la etapa a), el equilibrio se establece sorprendentemente a una longitud de polímero de alrededor de 5 después de un tiempo suficiente, de preferencia por ejemplo > 12 horas. Sin embargo, debido al equilibrio, la longitud del polímero (como se define por n) no se fija en un valor específico, por ejemplo 5, sino que puede variar en consecuencia dentro de la reacción de equilibrio.

45 Así, aproximadamente 5 puede significar alrededor de 4 a 6, o incluso alrededor de 3 a 7. Preferiblemente, la longitud del polímero y con ello el entero n (y así a, b y a + b) varía dentro de un límite de aproximadamente ±1 o ± 2.

50 Tal como se define aquí en la etapa 1a) del método para preparar el portador polimérico de acuerdo con la fórmula (I), se proporciona al menos una proteína o péptido catiónico o policatiónico como componente P<sup>2</sup> como se define aquí y/o al menos un polímero catiónico o policatiónico como componente P<sup>2</sup> como se define aquí, preferentemente en las relaciones

5 indicadas arriba por la fórmula (I). Estos componentes se mezclan, preferiblemente en un medio básico como el aquí definido, de preferencia en presencia de oxígeno o de otro iniciador como el aquí definido que lleva a condiciones de oxidación suaves, de preferencia a un pH y a una temperatura y en un tiempo como los aquí definidos, y entonces se condensan y polimerizan estos componentes unos con otros vía enlaces disulfuro (en una condensación de polimerización o policondensación) para obtener un componente repetitivo H-[S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub>-H.

10 En todos los casos, la etapa 1a) se basa en una reacción de equilibrio bajo condiciones de oxidación suaves, lo cual, después de balancear el estado de equilibrio, permite obtener ya sea el componente repetitivo de la invención H-[S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub>-H o el componente repetitivo de la invención H-{{[S-P<sup>2</sup>-S]<sub>a</sub>[S-(AA)<sub>x</sub>-S]<sub>b</sub>} en las relaciones molares deseadas. En el estado de equilibrio, n es preferiblemente 1, 2, 3, 4 ó 5 a 10, muy preferiblemente 4 a 9, y a + b = n es como se definió  
15 arriba, de preferencia a + b = 1, 2, 3, 4 ó 5 a 10, muy preferiblemente 4 a 9. Para este propósito, se contemplan largos tiempos de reacción para lograr un estado de equilibrio en la etapa a), con preferencia en particular por ejemplo > 12 horas. En consecuencia, la etapa a) del método para preparar un portador polimérico requiere típicamente al menos aproximadamente 5 horas, todavía más preferiblemente al menos alrededor de 7,5 horas o incluso 10 horas, en particular al menos alrededor de 12 horas, por ejemplo un tiempo de reacción de aproximadamente 12 a 60 horas, un tiempo de  
20 reacción de alrededor de 12 a 48 horas, un tiempo de reacción de aproximadamente 12 a 36 horas, o un tiempo de reacción de alrededor de 12 a 24 horas, donde el límite más bajo de 12 horas de éstos últimos intervalos también se puede ajustar a 10, 7,5 o incluso 5 horas.

25 En la etapa 1a), la al menos una proteína o péptido catiónico o policationico como componente P<sup>2</sup> como se define aquí y/o al menos un polímero catiónico o policationico como componente P<sup>2</sup> como se define aquí, y opcionalmente al menos un componente aminoácido (AA)<sub>x</sub> como el definido aquí, están contenidos preferentemente en un medio básico en la etapa a) del método para preparar el portador polimérico de acuerdo con la fórmula (I) (o cualquiera de sus sub-fórmulas, por ejemplo (Ia)). Este medio básico típicamente presenta un intervalo de pH de alrededor de 6 a aproximadamente 12, de preferencia un intervalo de pH de alrededor de 7 a aproximadamente 10, muy preferiblemente un intervalo de pH de  
30 alrededor de 8 a aproximadamente 10, por ejemplo alrededor de 8, 8,5, 9, 9,5 ó 10 o cualquier intervalo seleccionado de cualesquiera dos de éstos o de los valores mencionados arriba.

Además, preferentemente, la temperatura de la solución en la etapa 1a) está en un intervalo de aproximadamente 5°C a alrededor de 60°C, muy preferiblemente en un intervalo de alrededor de 15°C a aproximadamente 40°C, en especial en un intervalo de alrededor de 20°C a aproximadamente 30°C y en particular en un intervalo de alrededor de 20°C a aproximadamente 25°C, por ejemplo alrededor de 25°C.

35 En la etapa 1a) del método para preparar el portador polimérico de acuerdo con la fórmula (I) (o cualquiera de sus sub-fórmulas, por ejemplo (Ia)) como se define aquí se pueden usar tampones (hidrofilicos) adecuados. Los tampones preferentes pueden comprender tampones carbonato, borato, Bicina, CHES, CAPS, tampones que contengan etanolamina, HEPES, MOPS, tampón fosfato, PIPES, Tris, tampón de tricina, TAPS y/o TES. Es particularmente preferente un tampón carbonato.

40 Después de mezclar los componentes en la etapa 1a), preferiblemente en presencia de oxígeno, de preferencia en presencia de un medio básico como el aquí definido, se inicia la reacción de polimerización por condensación o policondensación. Para ello, la mezcla en la etapa 1a) preferentemente se expone a oxígeno o puede iniciarse usando otro iniciador, por ejemplo una cantidad catalítica de un oxidante, por ejemplo DMSO, etc. Para determinar la longitud de cadena de polímero deseada, la reacción de condensación tiene que llevarse a cabo bajo condiciones de oxidación suaves, preferentemente en presencia de menos de un 30% de DMSO, muy preferiblemente de menos de un 20% de DMSO y más preferiblemente de menos de un 10% de DMSO. Después del inicio de la reacción de polimerización por condensación o policondensación, la al menos una proteína o péptido catiónico o policationico y/o al menos un polímero catiónico o policationico como componente P<sup>2</sup> y opcionalmente al menos un componente aminoácido (AA)<sub>x</sub> como el aquí  
45 definido se condensan y entonces se polimerizan unos con otros vía enlaces disulfuro (condensación por polimerización o policondensación). En esta etapa de reacción 1a) preferentemente se forman polímeros lineales usando monómeros con al menos dos partes -SH reactivas, es decir, al menos una proteína o péptido catiónico o policationico y/o al menos un polímero catiónico o policationico como componente P<sup>2</sup> como el definido aquí, cada componente P<sup>2</sup> con al menos dos partes -SH libres como las aquí definidas, por ejemplo en sus extremos terminales. Sin embargo, pueden emplearse componentes P<sup>2</sup> con más de dos partes -SH libres, que pueden llevar a polímeros ramificados.

50 De acuerdo con una segunda etapa 1b) del método para preparar el portador polimérico de acuerdo con la fórmula (I) como se define aquí (o de acuerdo con cualquiera de sus sub-fórmulas), un polímero hidrófilo P<sup>1</sup> y/o P<sup>3</sup> como el definido aquí se añade al producto de condensación obtenido de acuerdo con la etapa a). En este contexto, los polímeros hidrófilos P<sup>1</sup> y/o P<sup>3</sup> como los definidos aquí preferentemente presentan al menos una parte -SH, muy preferiblemente sólo una parte -SH por cada polímero hidrófilo P<sup>1</sup> y/o P<sup>3</sup> como los definidos aquí, deteniendo así terminalmente la condensación de polimerización o policondensación de acuerdo con la etapa a) en la etapa c). Los polímeros hidrófilos P<sup>1</sup> y/o P<sup>3</sup> como se definen aquí pueden ser iguales o diferentes, pudiendo seleccionarse estos polímeros de acuerdo con las propiedades deseadas. Típicamente, los polímeros hidrófilos P<sup>1</sup> y/o P<sup>3</sup> como un todo pueden añadirse al producto de condensación  
55

obtenido de acuerdo con la etapa a) en una relación de aproximadamente 2:1 polímero hidrófilo P<sup>1</sup> y/o P<sup>3</sup>:producto de condensación obtenido de acuerdo con la etapa 1a).

De acuerdo con una alternativa, los polímeros hidrófilos P<sup>1</sup> y/o P<sup>3</sup> además pueden estar modificados ya sea con un componente L (ligando) como el aquí definido o con un componente (AA)<sub>x</sub> o [(AA)<sub>x</sub>]<sub>z</sub> como el aquí definido o tanto con un componente L (ligando) como el aquí definido como con un componente (AA)<sub>x</sub> o [(AA)<sub>x</sub>]<sub>z</sub> como el definido aquí.

De acuerdo con una etapa 2 adicional de los métodos de la invención, el ácido nucleico como se define aquí se agrega al portador polimérico de acuerdo con la fórmula (I) o a cualquiera de sus subfórmulas como se define aquí obtenido según la etapa 1c) o 1d), preferiblemente en las relaciones mencionadas anteriormente.

En general, los complejos de carga de portadores poliméricos se fabrican en un disolvente no orgánico (por ejemplo, agua, soluciones tampón que contienen sal o soluciones que contienen azúcar).

En una etapa adicional 3 de los métodos de la invención, los complejos de carga de portadores poliméricos se liofilizan opcionalmente para eliminar el disolvente. Por tanto, los complejos de carga portadores poliméricos liofilizados se pueden reconstituir directamente en la solución que contiene el disolvente orgánico que comprende el polímero (biodegradable). Además, la liofilización de los complejos de carga portadores poliméricos se puede usar para el almacenamiento de los complejos de carga portadores poliméricos antes del recubrimiento con el polímero (biodegradable) o la aplicación en un dispositivo médico o de diagnóstico mediante el recubrimiento con el polímero (biodegradable).

En una etapa 4 posterior, los complejos de carga portadores poliméricos se disuelven o mezclan con un disolvente, preferiblemente una solución que contiene un disolvente orgánico que permite mezclar con polímeros (biodegradables) solo solubles en disolventes orgánicos. Esta solución resultante de la etapa 4 (es decir, que comprende las nanopartículas así como el polímero (biodegradable)) también se denomina solución de recubrimiento.

Debido a la escasa solubilidad e inestabilidad de tales polímeros (biodegradables) en agua o más bien en disolventes no orgánicos y la escasa o baja solubilidad del ácido nucleico altamente hidrófilo en los disolventes orgánicos, fue una tarea técnica exigente desarrollar un polímero portador para la complejación de ácidos nucleicos que permitiera la solución en un disolvente orgánico.

Adicionalmente, dicho portador polimérico debe garantizar la integridad de la carga de ácido nucleico sin inducir una aglomeración irreversible o pérdida de actividad biológica.

El disolvente orgánico que se puede utilizar para recubrir el ácido nucleico que comprende nanopartículas como tales, o para recubrir el ácido nucleico que comprende nanopartículas en una superficie de dispositivos médicos o de diagnóstico mediante diferentes técnicas de recubrimiento (por ejemplo, recubrimiento por inmersión, secado por pulverización, recubrimiento por flujo o por centrifugado) puede elegirse de entre todos los disolventes orgánicos conocidos por el experto en la técnica que sean adecuados ello. Son particularmente preferentes los disolventes que comprenden alcoholes (por ejemplo metanol, etanol, i-propanol), éteres (por ejemplo dietil éter, metil t-butil éter, tetrahidrofurano) y acetona.

Además, el disolvente orgánico debe permitir que las nanopartículas puedan distribuirse homogéneamente en el polímero biodegradable disuelto a una alta concentración.

Una "solución que contiene disolvente orgánico", como se usa aquí comprende un disolvente orgánico. Estos disolventes orgánicos incluidos pueden elegirse entre todos los disolventes orgánicos conocidos por el experto en la técnica que sean adecuados para tales fines, en particular para disolver el polímero (biodegradable). Particularmente preferentes como disolventes orgánicos son alcoholes (por ejemplo metanol, etanol, i-propanol), éteres (por ejemplo dietil éter, metil t-butil éter, tetrahidrofurano), ésteres (por ejemplo acetato de etilo, acetato de metilo) y acetona. La solución que contiene el disolvente orgánico también puede comprender una mezcla de disolventes orgánicos. La solución conteniendo el disolvente orgánico comprende preferiblemente el disolvente orgánico en el intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 100%, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 80 a aproximadamente 100%, incluso más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 90 a aproximadamente 100%. Es particularmente preferente un mayor contenido de disolvente orgánico cuando se requiere la disolución del polímero (biodegradable). Si el polímero (biodegradable) ya está disuelto, el contenido de disolvente orgánico puede ser menor, pero preferiblemente no debe caer por debajo del límite de solubilidad para el polímero (biodegradable).

En particular, en la solución de recubrimiento que comprende las nanopartículas, así como el polímero biodegradable (por ejemplo la solución resultante del paso 4), la concentración final del contenido de disolvente orgánico en la solución es preferiblemente de una proporción en el rango de 50% a 100%, más preferiblemente a una proporción en el intervalo de 70% a 95%, e incluso más preferiblemente a una proporción en el rango de 80% a 95%. Si es necesario o beneficioso, el disolvente no orgánico en el que se disuelven los complejos de carga del portador polimérico resultante del paso 2 o 3 puede reemplazarse totalmente por el disolvente orgánico. En tales casos, el disolvente no orgánico se puede eliminar



5 por liofilización antes de la reconstitución en el disolvente orgánico. La solución de recubrimiento que resulta de la etapa 4 del método de recubrimiento de dispositivos médicos o de diagnóstico o implantes mediante polímeros (biodegradables) con el ácido nucleico que comprende nanopartículas para la inmovilización reversible y/o la liberación de fármacos se puede usar para recubrir un producto médico o una superficie o dispositivo de diagnóstico tal como se define aquí mediante procesos habituales conocidos en la técnica (por ejemplo revestimiento por inmersión, secado por pulverización, revestimiento por flujo y revestimiento por rotación).

Durante esta etapa, los complejos de carga del portador polimérico se inmovilizan reversiblemente en una matriz del polímero (biodegradable) recubierto sobre la superficie del dispositivo médico o de diagnóstico.

10 En este contexto, el experto en la materia no habría esperado que fuera posible generar una solución de recubrimiento homogénea conteniendo un disolvente orgánico y un bajo contenido de agua, comprendiendo la solución de recubrimiento homogénea nanopartículas estables (que comprenden ácido nucleico) basadas en proteínas/péptidos o polímeros catiónicos hidrófilos, por un lado, y polímeros hidrófobos (biodegradables) por otro lado, sin pérdida de integridad, actividad o estabilidad de las nanopartículas (que contienen ácido nucleico). Dichas soluciones de recubrimiento pueden usarse para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada del fármaco de dichas partículas de ácido nucleico, particularmente en dispositivos médicos o de diagnóstico como se define aquí.

15 De acuerdo con una realización, la presente invención se refiere al primer uso médico del ácido nucleico contenido en nanopartículas revestidas según la invención con un polímero biodegradable para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada de fármacos como se define aquí, como medicamento, preferentemente para la terapia génica o el tratamiento de una enfermedad como se define aquí. El medicamento puede estar en forma de una composición farmacéutica o en forma de un adyuvante o de una vacuna como una forma específica de composición farmacéutica. Una composición farmacéutica en el contexto de la presente invención comprende típicamente nanopartículas que contienen el ácido nucleico revestidas con un polímero (biodegradable) según la invención para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada de fármacos y opcionalmente ingredientes adicionales como los aquí definidos y opcionalmente un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable, de preferencia como el aquí definido.

20 De acuerdo con una realización, la presente invención está dirigida al uso del ácido nucleico contenido en nanopartículas revestidas según la invención con un polímero biodegradable para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada de fármacos o del dispositivo médico o de diagnóstico como se define aquí para la profilaxis, el tratamiento y/o la mejora de enfermedades como las definidas aquí. Preferentemente, tales enfermedades mencionadas aquí se seleccionan de cáncer o enfermedades tumorales, enfermedades infecciosas, de preferencia enfermedades infecciosas (virales, bacterianas o protozoológicas), enfermedades autoinmunes, alergias o enfermedades alérgicas, enfermedades monogenéticas, es decir enfermedades (hereditarias) o enfermedades genéticas en general, enfermedades que tienen un antecedente genético heredado y que son causadas típicamente por un defecto génico definido y son heredadas de acuerdo con las leyes de Mendel, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neuronales, enfermedades del sistema respiratorio, enfermedades del sistema digestivo, enfermedades de la piel, trastornos musculoesqueléticos, trastornos del tejido conectivo, neoplasmas, deficiencias inmunes, enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólicas, enfermedades oculares, enfermedades del oído y cualquier enfermedad que pueda ser influenciada por la presente invención. Es particularmente preferente en este contexto el tratamiento de pacientes tratados con dispositivos médicos, como stents coronarios o implantes para prevenir en particular la restenosis, calcificación, reacción a cuerpos extraños o la inflamación.

30 40 Particularmente preferido en este contexto es el tratamiento profiláctico o terapéutico de pacientes tratados con dispositivos médicos o implantes para la prevención de restenosis, calcificación, reacción a cuerpos extraños o inflamación.

45 De acuerdo con otra realización, la presente invención está dirigida al uso del ácido nucleico comprendido en nanopartículas revestidas con un polímero (biodegradable) para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada de medicamentos o del dispositivo médico o de diagnóstico de la invención para la inmunoterapia, la terapia génica, la vacunación, o a su uso como adyuvante.

50 De acuerdo con otra realización, la presente invención se dirige al ácido nucleico comprendido en nanopartículas revestidas con un polímero (biodegradable) para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada de medicamentos o del dispositivo médico o de diagnóstico de la invención, a la composición farmacéutica o la vacuna de la invención o a los dispositivos médicos de diagnóstico como se definen aquí para su uso en el tratamiento de enfermedades como las aquí definidas, particularmente la profilaxis, el tratamiento y/o la mejora de varias enfermedades como las aquí definidas, que comprende preferentemente utilizar o administrar a un paciente que lo requiera el ácido nucleico comprendido en nanopartículas revestidas con un polímero (biodegradable) para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada de medicamentos, la composición farmacéutica o la vacuna de la invención o el dispositivo médico o de diagnóstico de la invención como se definen aquí.

La presente invención también permite el tratamiento de enfermedades que no han sido heredadas o que podrían no ser incluidas bajo las categorías anteriores. Estas enfermedades pueden incluir, por ejemplo, el tratamiento de pacientes que requieran un factor proteínico específico, por ejemplo una proteína terapéuticamente activa específica como se menciona arriba. Esto puede incluir, por ejemplo, pacientes de diálisis, por ejemplo pacientes que sufran una diálisis de riñón o renal (regular), y que puedan necesitar proteínas terapéuticamente activas específicas como las definidas aquí, por ejemplo eritropoyetina (EPO), etc.

De acuerdo con una realización final, la presente descripción también comprende kits, particularmente kits de partes, que incluyen, como componentes solos o en combinación con ingredientes adicionales, el ácido nucleico comprendido en nanopartículas revestidas con un polímero (biodegradable) para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada de medicamentos de la invención, al menos una composición farmacéutica y/o kits que los comprenden y opcionalmente instrucciones técnicas con información sobre la administración y dosis del ácido nucleico comprendido en nanopartículas revestidas con un polímero (biodegradable) para la inmovilización reversible y/o la liberación controlada de medicamentos de la invención y/o de la composición farmacéutica de la invención. Estos kits, de preferencia kits de partes, pueden ser aplicados por ejemplo para cualquiera de las aplicaciones o usos mencionados arriba. Estos kits, cuando se presentan como un kit de partes, pueden contener además cada componente en una parte diferente del kit. Estos kits o kits de partes también pueden emplearse como herramientas de investigación o con propósito diagnóstico.

## Figuras

Las siguientes figuras están diseñadas para ilustrar la invención, sin limitar el objeto de la misma.

Figura 1: Expresión de la luciferasa en medio sobrenadante de células endoteliales. Se cultivaron 100.000 células EA hy 926 en cubreobjetos recubiertos por PLGA con ARNm que contiene nanopartículas. Se utilizaron diferentes PLGA. El sobrenadante de las células se utilizó para medir la expresión de la luciferasa después de 0, 6 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas y 6 días. Después de cada medida, las células se lavaron con PBS en exceso varias veces para eliminar la luciferasa. La RLU del ensayo de luciferasa siempre se añadió a la medida anterior. El control fue un cubreobjetos de cultivo celular sin recubrimiento.

Figura 2: Diagrama esquemático de la aplicación de placas metálicas recubiertas con ARNm contenido en nanopartículas de PLGA en injertos de venas porcinas. Las nanopartículas que contenían ARNm se recubrieron con PLGA en placas phynox. Así, el ARNm comprendido en nanopartículas se juntó con el PLGA pipeteado en placas de acero inoxidable (placas phynox). La solución se secó de nuevo durante la noche. La vena porcina recién escindida de la yugular se cortó longitudinalmente. Las venas se colocaron en una placa de 6 pocillos con 2 ml de medio endotelial (Vasculife, medio de crecimiento endotelial). Después, la placa phynox recubierta se colocó con el lado recubierto sobre el endotelio de la vena.

Figura 3: Expresión de luciferasa en medio sobrenadante tras 24 horas de transfección de injertos venosos porcinos con ARNm de luciferasa inmovilizado contenido en nanopartículas (20 mg/placa) recubiertas en placas de phynox con la ayuda de Lactel-PLGA (40 mg/placa). El procedimiento corresponde a la figura 2. El sobrenadante del medio se midió como se describe en el Ejemplo 5.

Figura 4: Expresión de luciferasa en medio sobrenadante después de 24 horas de transfección de injertos venosos porcinos con ARNm de luciferasa inmovilizado contenido nanopartículas (20 mg/placa) recubiertas en placas de phynox con la ayuda de Lactel-PLGA (40 mg/placa). En este experimento, el ARNm contenido en nanopartículas se preparó en diferentes soluciones; solución que contiene manosa o H<sub>2</sub>O.

Figura 5: muestra la secuencia de ARNm que codifica la luciferasa de *Gaussia* (SEC ID NO: 128). La secuencia de ARNm contiene los siguientes elementos de secuencia:

- la secuencia de codificación que codifica la luciferasa de *Gaussia*;
- secuencias estabilizadoras derivadas de la 3'-UTR de alfa-globina (muag (3'-UTR de alfa-globina mutada));
- 70x3 adenosinas en el extremo 3' terminal (cola poli-A);
- 30x3 citosinas en el extremo 3' terminal (cola poli-C).

Figura 6: muestra la secuencia de ADN correspondiente que codifica la luciferasa de *Gaussia* (SEC ID NO: 129).

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos están diseñados para ilustrar la invención. Los ejemplos no pretenden limitar el objeto de la invención a los mismos.

### 1. Preparación de constructos de ADN y ARNm que codifican para luciferasa de *Gaussia* (*Gaussia*)

Para los presentes ejemplos se prepararon secuencias de ADN que codificaban para luciferasa de *Gaussia* y se usaron para las reacciones de transcripción *in vitro* subsecuentes.

De acuerdo con una primera preparación, se preparó la secuencia de ADN, que corresponde a la secuencia de codificación de luciferasa de *Gaussia*. Además, se introdujeron secuencias derivadas de 3'-UTR de alfa-globina (muag (3'-UTR de alfa-globina mutada)), una secuencia tallo-bucle de histona, un tramo de 70 x adenosinas en el extremo 3' terminal (cola poli-A) y un tramo de 30x citosinas en el extremo 3' terminal (cola poli-C) 3' de la secuencia de codificación. La secuencia contiene los siguientes elementos de secuencia:

- la secuencia de codificación que codifica para luciferasa de *Gaussia*;
- secuencias de estabilización derivadas de la 3'-UTR de alfa-globina (muag (3'-UTR de alfa-globina));
- 70 x adenosinas en el extremo 3'-terminal (cola poli-A);
- 30 x citosinas en el extremo 3'-terminal (cola poli-C).

## 2. Transcripción *in vitro*

El plásmido de ADN respectivo preparado de acuerdo con el ejemplo 1 fue transcrito *in vitro* usando T7-polimerasa. Posteriormente el ARNm se purificó usando PureMessenger® (CureVac, Tübingen, Alemania). En la SEC ID No: 129 (ver Figura 6) se muestra la secuencia de ADN correspondiente al ARNm.

## 3. Reactivos:

Péptidos: Los péptidos usados en los presentes experimentos fueron los siguientes:

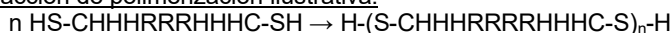
PB83: HO-PEG<sub>5000</sub>-S-(S-CHHHHHRRRRHHHHHC-S)-<sub>7</sub>-S-PEG<sub>5000</sub>-OH

## 4. Síntesis del portador polimérico:

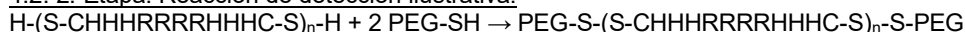
La reacción de condensación se llevó a cabo con la cantidad calculada de péptido (componente P<sup>2</sup>) que se disuelve en una mezcla de una solución tampón acuosa a pH 8,5 con un aditivo opcional, 5% (v/v) de sulfoxido de dimetilo (DMSO) (que son condiciones de oxidación suaves y por tanto permiten establecer un equilibrio) y se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. Posteriormente la cantidad calculada de un grupo tiol contenido en un derivado de PEG (alfa-metoxi-omega-mercaptopoli(etilenglicol)) (componente P<sup>1</sup>) (disuelto en agua) se añade y la solución resultante se agita durante otras 18 horas. La liofilización y purificación subsecuentes producen el polímero deseado. La relación entre el componente PEG P<sup>1</sup> y el componente péptido P<sup>2</sup> define la longitud de la cadena del polímero P<sup>2</sup>.

La reacción de condensación en este ambiente de reacción es reversible, por tanto la longitud de cadena del polímero viene determinada por la cantidad de compuesto monotiol que termina la reacción de polimerización. En resumen, la longitud de la cadena polimérica se determina por la relación entre el oligopéptido y el componente monotiol. Esta reacción es soportada por las condiciones de oxidación suaves seleccionadas. Con condiciones de oxidación más severas (30% de DMSO), se induce la generación de polímeros de alto peso molecular (cadena larga).

### 4.1. 1. Etapa: Reacción de polimerización ilustrativa:

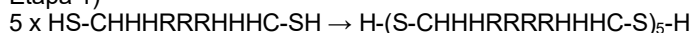


### 4.2. 2. Etapa: Reacción de detección ilustrativa:

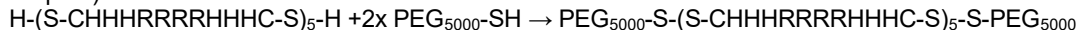


### 4.3. Reacción de síntesis ilustrativa:

Etapa 1)



Etapa 2)



Para lograr una longitud de polímero de 5 (n = 5), se usó una relación molar péptido:PEG de 5:2.

Se hicieron algunas variaciones de la reacción de síntesis para demostrar el efecto de las cadenas de PEG y los efectos de la fijación reversibles de las cadenas de PEG.

### 4.4. Reacción de síntesis para portadores poliméricos sin cadenas de PEG:

Las condiciones de reacción son iguales a las mencionadas arriba, pero la etapa de la adición de un derivado de PEG que contiene sulfhidrilo no se lleva a cabo/se salta.

### 4.5. Síntesis de reacción para cadenas de PEG unidas irreversibles:

Las condiciones de reacción son iguales a las mencionadas arriba, pero en lugar de un derivado de PEG que contiene sulfhidrilo se utiliza un derivado de PEG que contiene maleimida. La parte maleimida reacciona rápidamente con los grupos sulfhidrilo libres formando un enlace covalente. Por tanto, la terminación de la polimerización no es bajo las

condiciones de equilibrio dinámico como para los derivados de PEG que contienen sulfhidrilo, sino bajo condiciones irreversibles, lo cual se traduce en un patrón de polimerización “congelado” de alta polidiversidad y no en los productos de reacción definidos de la reacción de equilibrio dinámico.

**5. Complejación de ARN:**

- 5 El constructo de ARNm definida arriba en el Ejemplo 1 y preparado de acuerdo con el Ejemplo 2 se complejó para los efectos de la presente invención con los polímeros, de preferencia como se define en el Ejemplo 4. Así, 4 µg de ARN que codifica para luciferasa de *Gaussia* según la SEQ ID NO: 128 se mezclaron en relaciones molares como se indica con el portador polimérico (de acuerdo con la fórmula I), formando así un complejo. Posteriormente la solución resultante se ajustó con agua hasta un volumen final de 50 µl y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 10 Se muestran a continuación las relaciones portador polimérico/ARN usadas en los experimentos.

Prefijo	Polímero	Relación	AS catiónicos	N/P
PB83	HO-PEG <sub>5000</sub> -S-(SCHHHHHRRRRHHHHHC-S-) <sub>7</sub> -SPEG <sub>5000</sub> -OH	250	28	2,8
<p>Relación = relación molar ARN:péptido                      AS catiónico = aminoácidos catiónicos cargados positivamente a pH fisiológico (es decir, no histidina (H) sino por ejemplo arginina (R)).                      N/P = es la relación entre los átomos de nitrógeno básicos en el portador polimérico y los residuos de fosfato en el ácido nucleico, considerando que los átomos de nitrógeno confieren las cargas positivas y fosfato del esqueleto de fosfato de ácido nucleico confiere la carga negativa. Los residuos de histidina se cuentan neutros, toda vez que la formación de complejos se lleva a cabo a pH fisiológico, por tanto el residuo de imidazol no está cargado.                      N/P se calcula por la siguiente fórmula:</p> $N/P = \frac{\text{pmoles[ARN]} * \text{relación} * \text{AS catiónicos}}{\mu\text{g ARN} * 3 * 1000}$ <p>Para los cálculos se aplica ARNm que codifican para Gaussia de acuerdo con la SEQ ID NO: 128, que tiene un peso molecular de kDa. Por tanto 1 µg de ARN de acuerdo con la SEQ ID NO: 128 confiere a pmol de ARNm de acuerdo con la SEQ ID NO: 128.</p>				

**6. Revestimiento de los complejos poliméricos de carga con el polímero biodegradable PLGA**

- En los experimentos se emplearon diferentes PLGA.
- 15 1. Lactel, PLGA, sin indicación de peso molecular, ratio 50:50, terminado en éster  
 2. Sigma Aldrich, Resomer RG 752 H, catno. 719919, terminado en ácido poli(DL-lactida-co-glicólido), (72:25), PM 4000-15000  
 3. Sigma Aldrich, Resomer RG 502 H, catno. 719897, terminado en ácido poli(DL-lactida-co-glicólido), (50:50), PM 7000-17000  
 20 4. Sigma Aldrich, Resomer RG 504 H, catno. 719900, terminado en ácido poli(DL-lactida-co-glicólido), (50:50), PM 38000-54000

Se mezclaron 100 µl de la solución que comprendía las nanopartículas con ARNm preparadas de acuerdo con el Ejemplo 5 (medio basal, 18 µg de nanopartículas conteniendo ARNm y 7 ml de interferina) con 100 µl de solución de PLGA al 0,05% (disuelto en acetona al 100%).

**7. Transfección de células endoteliales**

La solución preparada según el Ejemplo 6 se pipeteó por duplicado en cubreobjetos (Thermanox Plastic Coverslips de 15 mm de diámetro) en una o en una segunda repetición para evitar que la solución se alejara del cubreobjetos. La solución en los cubreobjetos se secó durante la noche a temperatura ambiente en condiciones estériles y corresponde a 18 µg de ARNm contenido en nanopartículas recubiertas con 50 mg de PLGA en un porta.

Al día siguiente, se cultivaron células EA.hy 926, que son células endoteliales inmortalizadas, en los cubreobjetos con 1 ml de medio (DMEM alto en glucosa, complementado con L-glutamina y antibióticos). Alrededor de 100.000 células se cultivaron en el cubreobjetos.

La medición de la luciferasa secretada se realizó 6 h, 24 h, 48 h, 72 h y 6 días después del cultivo. Después de cada medición, las células se lavaron con PBS en exceso para eliminar la enzima luciferasa. Para cada medición, se pipetearon

20 µl de sobrenadante celular en un pocillo de una placa de 96 pocillos. El tampón de medición era PBS sin Ca y Mg, suplementado con NaCl 5 mM y 0,04 mg de Coelenterazien. Con el Mithras LB 940 (Berthold), se inyectaron 100 µl del tampón de medición en 20 µl de sobrenadante. La detección de luminiscencia (RLU) se realizó durante 10 segundos con el aparato Mithras. Para calcular la expresión de luciferasa, la RLU de cada medición se añadió a la anterior.

5

## 8. Expresión de luciferasa *ex vivo*

### 8.1 Revestimiento de placas Phynox (placas de acero inoxidable)

Las nanopartículas que contienen ARNm que codifican luciferasa de *Gaussia* se formularon a una concentración de 0,1 g/l. Se mezclaron 200 µl de esta solución con una solución de igual volumen que contenía 40 mg de PLGA en acetona. La solución de recubrimiento se aplicó a las placas y, después de secar a temperatura ambiente durante la noche, las placas estaban listas para su uso en estudios de transfección.

10

### 8.2. Transfección de injertos venosos

Se incubó tejido lumen recién preparado de vena yugular externa (cerdo) en placas de 6 pocillos en 2 ml de medio. Las placas metálicas recubiertas se colocaron en la parte superior del tejido (endotelio), lo que permitió el contacto directo de la matriz de PLGA con las células. Después de 24 h, se cuantificó la cantidad de luciferasa de *Gaussia* expresada en el sobrenadante (véase el Ejemplo 7).

15

## 11. Resultados

### 11.1. Expresión de luciferasa en células EA.hy926

Los resultados muestran que todas las células que crecen en el cubreobjetos con ARNm inmovilizado con PLGA contenido en nanopartículas secretan luciferasa, en comparación con las células de control que crecen en placas sin ARNm contenido en nanopartículas codificando para la luciferasa de *Gaussia*. Además, las células cultivadas en el resómero de PLGA 752 con una relación de 75:25 demuestran una expresión más alta de luciferasa en comparación con los resómeros 50:50. La RLU de cada punto de medición se añadió al anterior, lo que resultó en una curva que muestra una liberación brusca entre 0-24 h, por la disociación del ARNm fuera del recubrimiento de PLGA. Luego, la expresión de luciferasa aumenta lentamente, lo que indica la hidrolización del PLGA.

20

25

### 11.5. Expresión de luciferasa *ex vivo*:

La expresión de luciferasa en injertos venosos porcinos se determinó 24 horas después de la aplicación de placas metálicas recubiertas con PLGA con complejos de carga de portadores poliméricos que comprenden 20 µg de ARNm que codifica la luciferasa de *Gaussia*. La luciferasa secretada se midió de nuevo en el medio de células endoteliales circundantes. Como puede verse en la Fig. 3, el recubrimiento de PLGA de las placas metálicas con el ARNm contenido en nanopartículas conduce a una alta expresión de luciferasa en los injertos de venas porcinas.

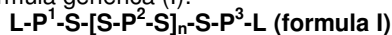
30

Además, la expresión de luciferasa en injertos de vena porcina 24 horas después de la aplicación de placas metálicas recubiertas por PLGA con complejos de carga de portador polimérico es independiente del medio portador polimérico que contenía manosa o H<sub>2</sub>O, como se muestra en la Figura 4.

35

## REIVINDICACIONES

1. Nanopartículas que comprenden o consisten en un complejo de un ácido nucleico, que es ADN o ARN, y una molécula portadora polimérica de fórmula genérica (I):



donde

$P^1$  y  $P^3$  son iguales o diferentes entre sí y representan una cadena polimérica hidrófila lineal o ramificada, presentando cada  $P^1$  y  $P^3$  al menos una porción -SH capaz de formar un enlace disulfuro por condensación con el componente  $P^2$ , seleccionándose la cadena polimérica hidrófila ramificada o lineal, independientemente, de entre polietilenglicol (PEG), poli-*N*-(2-hidroxipropil)metacrilamida, poli-2-(metacriloiloxi)etilfosforilcolinas, poli(hidroxiálquil-L-asparagina), poli-(2-(metacriloiloxi)etil-fosforilcolina), hidroxietilalmidón o poli(hidroxiálquil-L-glutamina), donde la cadena polimérica hidrófila tiene un peso molecular de aproximadamente 1 kDa a 100 kDa;

$P^2$  es un péptido o proteína catiónico o policatiónico de una longitud de 3 a 100 aminoácidos, o es un polímero catiónico o policatiónico con un peso molecular de 0,5 kDa a 30 kDa; presentando cada  $P^2$  al menos dos porciones -SH capaces de formar un enlace disulfuro después de condensación con otros componentes  $P^2$  o componente(s)  $P^1$  y/o  $P^3$ ;

-S-S- es un enlace (reversible) disulfuro;

L es un ligando opcional, que puede estar presente o no, y se puede seleccionar, independientemente, de entre RGD, transferrina, folato, un péptido señal o una secuencia de señal, una señal o secuencia de localización, una señal o secuencia de localización nuclear (NLS), un anticuerpo, un péptido de penetración celular, TAT, un ligando de un receptor, citoquinas, hormonas, factores de crecimiento, moléculas pequeñas, carbohidratos, manosa, galactosa, ligandos sintéticos, agonistas de moléculas pequeñas, inhibidores o antagonistas de receptores, análogos de peptidomimético RGD y

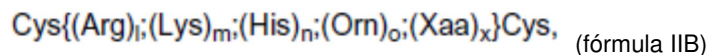
$n$  es un entero seleccionado de un intervalo de 1 a 50, preferentemente de un intervalo de 1, 2, 3, 4 ó 5 a 10, muy preferiblemente en un intervalo de 1, 2, 3 ó 4 a 9;

donde la nanopartícula está recubierta con un polímero biodegradable y el polímero biodegradable es un polímero PLGA.

2. Nanopartícula según la reivindicación 1, donde la molécula de portador polimérico además contiene un componente aminoácido (AA)<sub>x</sub>, siendo x un entero seleccionado de un intervalo de 1 a 100.

3. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde la porción -SH del o de los componentes  $P^2$  del vehículo polimérico es proporcionada por una cisteína.

4. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el componente  $P^2$  del portador polimérico se selecciona de un péptido que comprende un péptido catiónico de fórmula (IIb):



donde

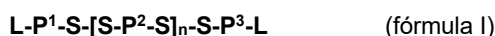
$i + m + n + o + x = 8-15$ , y  $i, m, n$  u  $o$ , independientemente unos de otros, puede ser cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15, siempre que el contenido total de Arg, Lys, His y Orn represente al menos el 10% de todos los aminoácidos del oligopéptido; y donde Xaa puede ser cualquier aminoácido seleccionado de aminoácidos nativos o no nativos excepto Arg, Lys, His u Orn; y donde  $x$  puede ser cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14, siempre que el contenido total de Xaa no exceda el 90% de todos los aminoácidos del oligopéptido.

5. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el ácido nucleico se proporciona en una relación molar molécula portadora polimérica:ácido nucleico de 5 a 10.000.

6. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el ADN o el ARN es ADN codificador, un ARN codificador, un ARNm codificador, un ARNsi, un ácido nucleico inmunoestimulador CpG o un ARN inmunoestimulador (ARNis)

7. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el ácido nucleico codifica para una proteína o péptido terapéuticamente activo, un antígeno, incluyendo antígenos tumorales, antígenos patógenos, antígenos animales, antígenos virales, antígenos protozoarios, antígenos bacterianos, antígenos alérgicos, antígenos autoinmunes, alérgenos, anticuerpos, proteínas o péptidos inmunoestimuladores o receptores de células T específicos de antígenos.

8. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el polímero de PLGA está definido por un peso molecular promedio en el intervalo de 4 kDa a 210 kDa, más preferiblemente en el intervalo de 10 kDa a 110 kDa, incluso más preferiblemente en el intervalo de 20 kDa a 80 kDa.
- 5 9. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la proporción de ácido láctico en el polímero de PLGA está en el intervalo del 25 al 100%, y preferiblemente en el intervalo del 25 al 85%.
10. Composición que comprende una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y opcionalmente un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. Composición según la reivindicación 10, donde la composición es una composición farmacéutica y/o una vacuna.
- 10 12. Método para preparar una nanopartícula recubierta como se define en las reivindicaciones 1 a 9, comprendiendo el método las siguientes etapas:
- a) proporcionar una nanopartícula que comprende o consiste en un complejo de un ácido nucleico, que es ADN o ARN, y una molécula portadora polimérica de acuerdo con la fórmula genérica (I):



donde

15 P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup> son iguales o diferentes entre sí y representan una cadena polimérica hidrófila lineal o ramificada, presentando cada P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup> al menos una porción -SH capaz de formar un enlace disulfuro después de condensación con el componente P<sup>2</sup>, seleccionándose la cadena polimérica hidrófila ramificada o lineal, independientemente, de entre polietilenglicol (PEG), poli-N-(2-hidroxipropil)metacrilamida, poli-2-(metacrililoixi)etilfosforilcolinas, poli(hidroxialquil-L-asparagina), poli-(2-(metacrililoixi)etil-fosforilcolina), hidroxietilalmidón o poli(hidroxialquil-L-glutamina), donde la cadena polimérica hidrófila tiene un peso molecular de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 100 kDa,

20

P<sup>2</sup> es un péptido o proteína catiónico o policatiónico con una longitud de 3 a 100 aminoácidos, o es un polímero catiónico o policatiónico con un peso molecular de 0,5 kDa a 30 kDa, presentando cada P<sup>2</sup> al menos dos porciones -SH capaces de formar un enlace disulfuro después de condensación con otros componentes P<sup>2</sup> o componente(s) P<sup>1</sup> y/o P<sup>3</sup>,

25

-S-S- es un enlace (reversible) disulfuro,

L es un ligando opcional, que puede estar presente o no, y se puede seleccionar, independientemente, de entre RGD, transferrina, folato, un péptido señal o una secuencia de señal, una señal o secuencia de localización, una señal o secuencia de localización nuclear (NLS), un anticuerpo, un péptido de penetración celular, TAT, un ligando de un receptor, citoquinas, hormonas, factores de crecimiento, moléculas pequeñas, carbohidratos, manosa, galactosa, ligandos sintéticos, agonistas de moléculas pequeñas, inhibidores o antagonistas de receptores o análogos de peptidomimético RGD, y

30

n es un entero seleccionado de un intervalo de 1 a 50, preferiblemente en un intervalo de 1, 2, 3, 4 o 5 a 10, con mayor preferencia en un intervalo de 1, 2, 3 o 4 a 9, y

- 35 b) poner en contacto, preferiblemente mezclando, la nanopartícula de a) con un polímero de PLGA biodegradable en una solución que contiene un disolvente orgánico, y
- c) opcionalmente eliminar, por ejemplo mediante secado, el disolvente orgánico y, cuando sea apropiado, cualquier otro disolvente de la solución que contiene disolvente orgánico.

13. Método según la reivindicación 12, comprendiendo el método las siguientes etapas:

40 I. Preparar el portador polimérico de acuerdo con la fórmula (I) (o cualquiera de sus subfórmulas):

- a) proporcionando al menos una proteína o péptido catiónico o policatiónico como componente P<sup>2</sup> y/o al menos un polímero catiónico o policatiónico como componente P<sup>2</sup> y opcionalmente al menos otro componente (AA)<sub>x</sub>, mezclar estos componentes, preferentemente en un medio básico, preferiblemente en presencia de oxígeno o de otro iniciador que lleve a condiciones de oxidación suave, y entonces condensado y así polimerizando

estos componentes entre sí vía enlaces disulfuro en una condensación de polimerización o policondensación para obtener un componente repetitivo  $H-[S-P2-S]_n-H$  o  $H\{[S-P^2-S]_a[S(AA)x-S]_b\}_nH$ , etc.;

- 5 b) proporcionar un polímero hidrófilo  $P^1$  y/o  $P^3$  como se define según la reivindicación 1, opcionalmente modificado con un ligando L y/o un componente aminoácido (AA)x como se define según las reivindicaciones 1 o 2, respectivamente;
- c) mezclar el polímero hidrófilo  $P^1$  y/o  $P^3$  de acuerdo con la etapa (b) con el componente repetitivo  $H-[S-P2-S]_n-H$  o  $H\{[S-P^2-S]_a[S(AA)x-S]_b\}_nH$  obtenido de acuerdo con la etapa a) en una relación 2:1, y entonces concluir típicamente la reacción de condensación por polimerización o de policondensación y obtener el portador polimérico de acuerdo con la fórmula (I) o (Ia);
- 10 d) opcionalmente purificar la molécula portadora polimérica obtenida de acuerdo con la etapa c).

II. Complejación del portador polimérico con la carga de ácido nucleico:

añadir un ácido nucleico, que es ADN o ARN, al portador polimérico obtenido de acuerdo con la etapa Ic) o Id) y complejar el ácido nucleico con el portador polimérico obtenido de acuerdo con la etapa Ic) o Id) para obtener el complejo de carga portador polimérico.

15 III. Opcionalmente liofilización del complejo de carga portador polimérico:

- a) opcionalmente, liofilizar el complejo de carga del portador polimérico obtenido en el paso II
- b) antes de recubrir con el polímero biodegradable de PLGA, reconstituir los complejos de carga del portador polimérico en un disolvente, preferiblemente en una solución que contiene un disolvente orgánico.

20 IV. Mezclar la solución resultante del paso II o III con el polímero biodegradable de PLGA disuelto en una solución que contiene el disolvente orgánico.

V. Eliminar opcionalmente, por ejemplo secando, el disolvente orgánico y/o, cuando sea apropiado, cualquier otro disolvente en la solución resultante del paso IV.

14. Método según las reivindicaciones 12 o 13, donde la solución que contiene el disolvente orgánico comprende o consiste en acetona, etanol y/o THF.
- 25 15. Nanopartícula recubierta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso como un medicamento.
16. Nanopartícula recubierta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o composición farmacéutica o vacuna según la reivindicación 10 o la reivindicación 11 para su uso en la profilaxis, el tratamiento y/o la mejora de enfermedades seleccionadas de cáncer o enfermedades tumorales, enfermedades infecciosas, preferentemente enfermedades infecciosas (virales, bacterianas o protozoológicas), enfermedades autoinmunes, alergias o enfermedades alérgicas, enfermedades monogénicas, es decir enfermedades (hereditarias), o enfermedades genéticas en general, enfermedades que tienen un antecedente genético hereditario y que típicamente son causadas por un defecto genético definido y se heredan de acuerdo con las leyes de Mendel, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neuronales, enfermedades del sistema respiratorio, enfermedades del sistema digestivo, enfermedades de la piel, trastornos musculoesqueléticos, trastornos del tejido conectivo, neoplasmas, inmunodeficiencias, enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólicas, enfermedades oculares y enfermedades del oído.
- 30 17. Nanopartícula recubierta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o composición según la reivindicación 10 o la reivindicación 11 para su uso en la prevención o el tratamiento de restenosis, calcificación, reacciones a cuerpos extraños y/o inflamación.
- 35 18. Dispositivo médico o de diagnóstico, en particular un stent o un implante, que comprende una nanopartícula recubierta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 40 19. Dispositivo según la reivindicación 18, donde la nanopartícula está contenida en un revestimiento de una superficie del dispositivo.



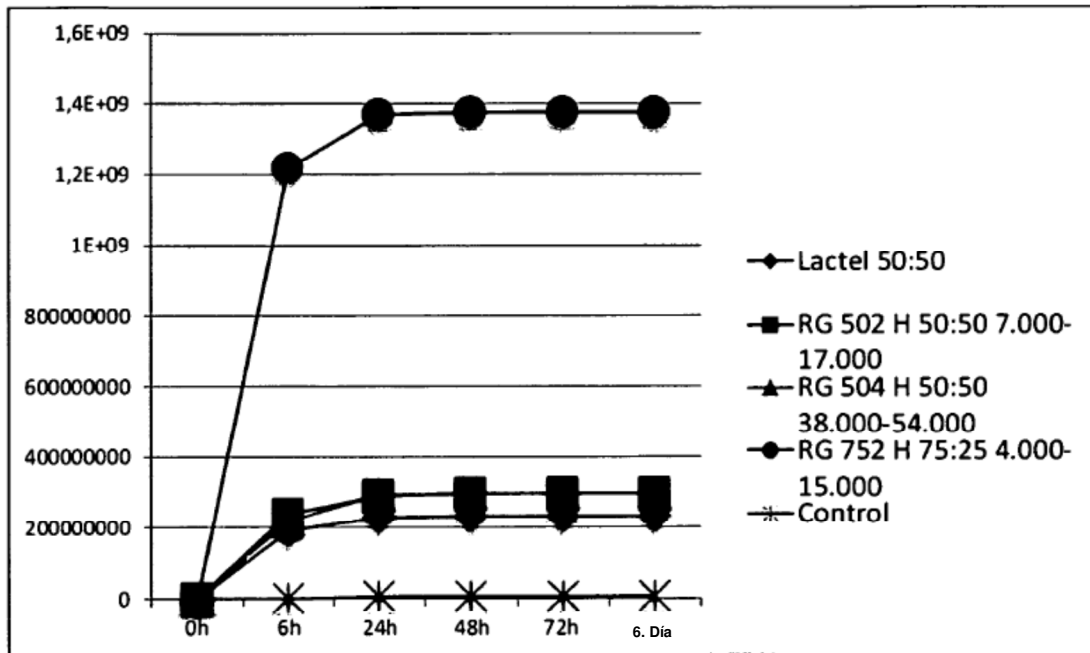
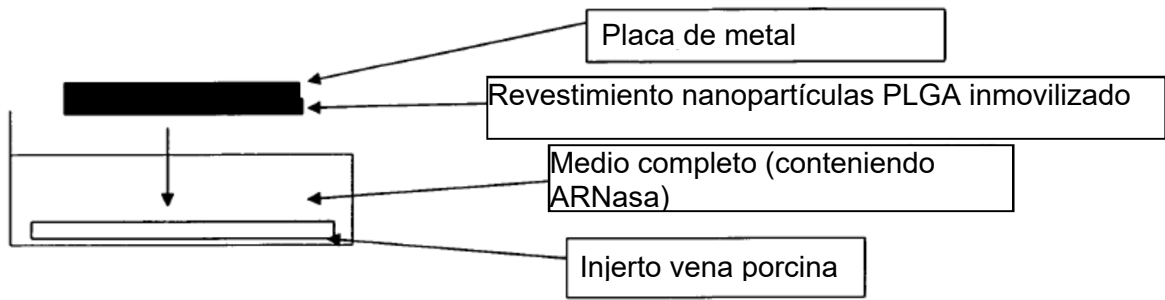


Fig.1



La placa de metal revestida se dispone sobre la superficie superior del injerto de vena

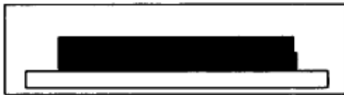


Fig.2

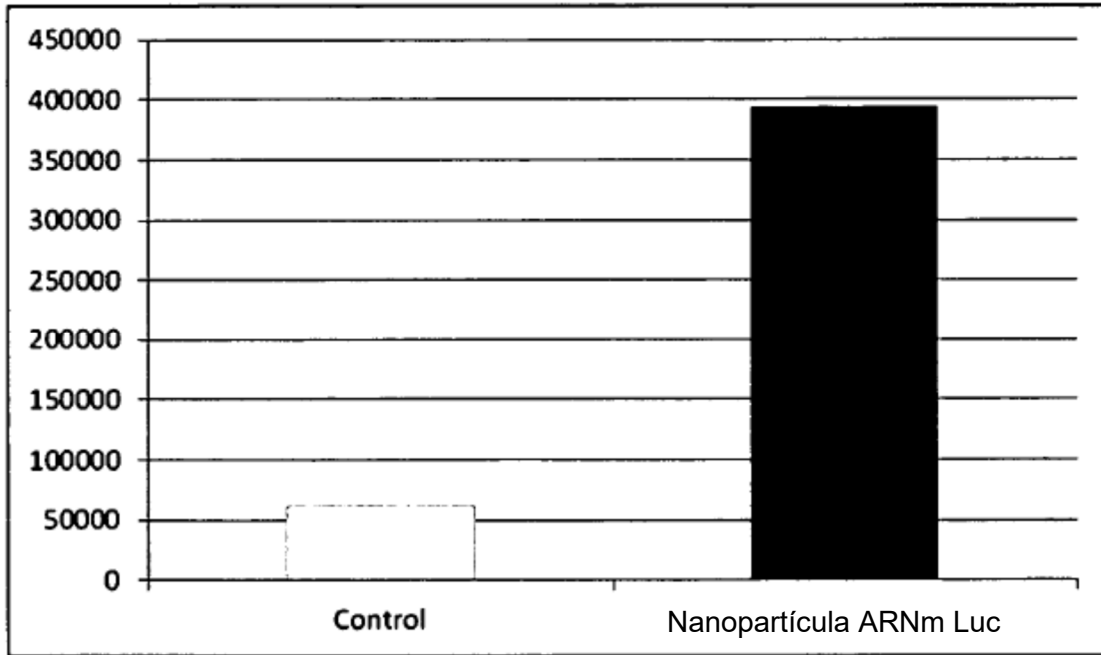


Fig. 3

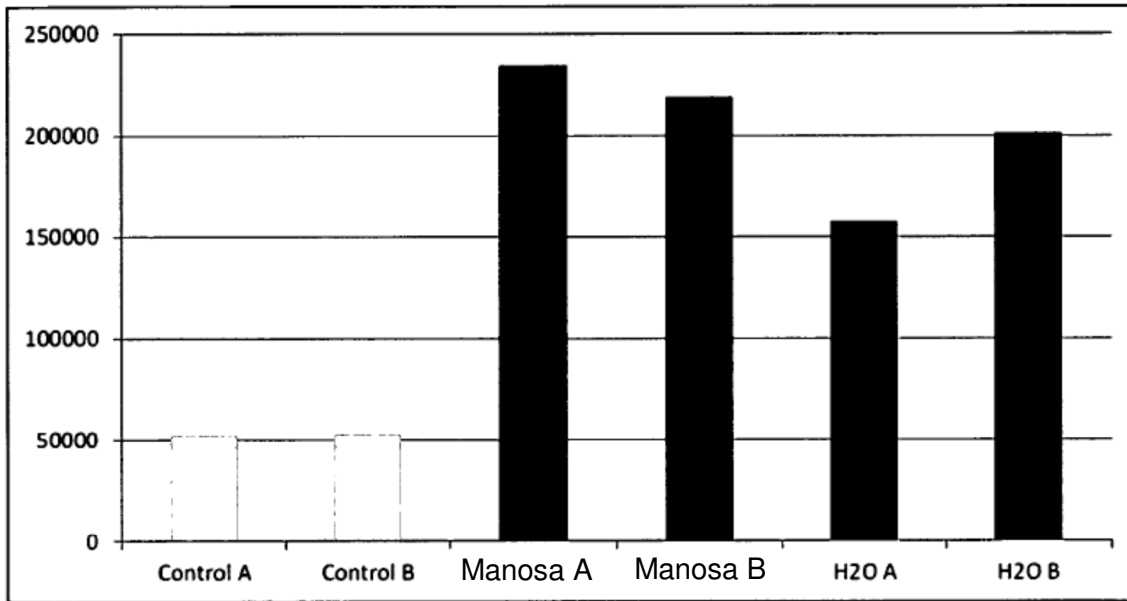


Fig. 4

GGGAGAAAGCGAUCCAGCCACCAUGGGAGUCAAAAGUUCUGUUUGCCCUGAUCUGCAUCGC  
UGUGGCCGAGGCCAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACUUCAACAUCGUGGCCGUGGCCAG  
CAACUUCGCGACCACGGAUCUCGAUGCUGACCGCGGGAAGUUGCCCGCAAGAAGCUGCC  
GCUGGAGGUGCUCAAAGAGAUGGAAGCCAAUGCCCCGAAAGCUGGCUGCACCAGGGGCUG  
UCUGAUCUGCCUGUCCCAUCAAGUGCACGCCAAGAUGAAGAAGUUCAUCCAGGACG  
CUGCCACACCUACGAAGGCGACAAAGAGUCCGCACAGGGCGGCAUAGGCGAGGCGAUCGU  
CGACAUUCCUGAGAUUCCUGGGUUAAGGACUUGGAGCCCAUGGAGCAGUUCAUCGCACA  
GGUCGAUCUGUGUGUGGACUGCACAACUGGCUGCCUCAAGGGGUUGCCAACGUGCAGUG  
UUCUGACCUGCUCAAGAAGUGGCUGCCGCAACGCUGUGCGACCUUUGCCAGCAAGAUCCA  
GGCCAGGUGGACAAGAUAAGGGGGCCGGUGGUGACUAAGCGGCCGCUCGAGCAUGCAU  
CUAGUUAUAAGACUGACUAGCCCGAUGGGCCUCCCAACGGGCCUCCUCCCUCCUUGCA  
CCGAGAUUAUAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAUUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCUCUAG

Fig. 5

GGGAGAAAGCGATCCAGCCACCATGGGAGTCAAAGTTCTGTTTGCCCTGATCTGCATCGC  
TGTGGCCGAGGCCAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGTGGCCGTGGCCAG  
CAACTTCGCGACCACGGATCTCGATGCTGACCGCGGGAAGTTGCCCGGCAAGAAGCTGCC  
GCTGGAGGTGCTCAAAGAGATGGAAGCCAATGCCCGGAAAGCTGGCTGCACCAGGGGCTG  
TCTGATCTGCCTGTCCCACATCAAGTGCACGCCCAAGATGAAGAAGTTCATCCCAGGACG  
CTGCCACACCTACGAAGGCGACAAAGAGTCCGCACAGGGCGGCATAGGCGAGGCGATCGT  
CGACATTCCTGAGATTCTGGGTTCAAGGACTTGGAGCCCATGGAGCAGTTCATCGCACA  
GGTCGATCTGTGTGTGGACTGCACAACCTGGCTGCCTCAAAGGGCTTGCCAACGTGCAGTG  
TTCTGACCTGCTCAAGAAGTGGCTGCCGCAACGCTGTGCGACCTTTGCCAGCAAGATCCA  
GGCCAGGTGGACAAGATCAAGGGGGCCGGTGGTGAATAAGCGGCCGCTCGAGCATGCAT  
CTAGTTATAAGACTGACTAGCCCGATGGGCCTCCCAACGGGCCCTCCTCCCCTCCTTGCA  
CCGAGATTAATAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAATATCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCTCTAG

Fig. 6