

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 286**

51 Int. Cl.:

C07K 14/475 (2006.01)

A61K 47/64 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2014** **PCT/GB2014/053764**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015** **WO15092417**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2014** **E 14821249 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019** **EP 3082871**

54 Título: **Transducción**

30 Prioridad:

18.12.2013 GB 201322396

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

28.11.2019

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF NOTTINGHAM (100.0%)
University Park Nottingham
Nottinghamshire NG7 2RD, GB

72 Inventor/es:

DIXON, JAMES;
SHAKESHEFF, KEVIN y
DENNING, CHRIS

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 733 286 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

Transducción

5 Esta invención se refiere a la transducción de moléculas de carga en células vivas, tales como la transducción de proteínas, en particular los métodos de transducción, los métodos de producción o modificación de la carga para la transducción, las moléculas de administración para la transducción y los métodos de tratamiento utilizando la transducción, o el uso de células transducidas.

10 Con las herramientas completas para el genoma humano y un transcriptoma definido, la investigación se centra ahora en la anotación funcional del proteoma para permitir la selección inteligente de dianas terapéuticas para la traducción clínica {Zografos, 2013 N.º 86}. La interacción de la proteína y cómo esto modifica la función complicará aún más la elección del objetivo y la funcionalidad de la proteína deberá determinarse y validarse en modelos normales y enfermos {Natrajan, 2013 N.º 89}. Los enfoques basados en el ADN y el ARN, tal como la transgénesis del ADN y los oligonucleótidos de pequeña interferencia/antisentido que median la regulación ascendente o inactivación génica son herramientas invaluable {Yamaguchi, 2009 N.º 87}. Sin embargo, estos enfoques pueden no ser clínicamente relevantes debido a la modificación genética o pueden no corresponder con precisión a la actividad de la proteína debido a la falta de correlación entre la transcripción y los niveles de proteína {Peng, 2011 N.º 88}. La administración de proteínas directamente en lugar de construcciones de ADN o moléculas de ARN tiene varias ventajas; siendo la más notable que el agente activo se administra directamente en lugar de depender de un sistema para generar esto mediante la maquinaria intracelular {Gump, 2007 N.º 39}.

La alteración de la función proteica en las células se ha limitado en la práctica históricamente a transformar genéticamente las células con ADN que se construyen en una construcción de vector, tal como un vector lentiviral. Esto significa que las células llevan material genético exógeno que incluye los genes adicionales deseados y también el ADN vector que se requiere para la modificación de las células y la expresión de las construcciones génicas exógenas. Este ADN heterólogo potencialmente puede causar problemas con la herencia genética, por ejemplo, en terapias de células humanas. Como ejemplo, la generación de células madre pluripotentes inducidas (células iPS) se puede lograr mediante la transducción genética de genes asociados a la reprogramación específicos utilizando vectores retrovirales o lentivirales. Sin embargo, un obstáculo para el uso terapéutico de esta tecnología es la producción de lesiones mutagénicas de inserción que son potencialmente tumorigénicas. Una posible estrategia para reemplazar completamente la administración de genes es la transducción de proteínas.

Otras terapias potenciales de transducción de proteínas podrían incluir la diferenciación miogénica de células madre adultas humanas (hASC), por ejemplo, para el tratamiento de trastornos musculares.

El objetivo de la invención es poder omitir el uso de construcciones de ADN y en su lugar transducir células directamente con proteína sin la necesidad de construcciones de ADN.

Se conoce la transducción de células con proteína sin el uso de construcciones de ADN y existe un número cada vez mayor de moléculas de administración potentes conocidas por promover la transducción de grandes cargas moleculares, tales como proteínas, péptidos, oligonucleótidos y nanopartículas en una amplia diversidad de células {El-Andaloussi, 2005 N.º 36}. La transducción celular mediada por el dominio de transducción de proteínas peptídicas catiónicas (PTD) representa un enfoque de entrada celular con un enorme potencial para la administración de macromoléculas terapéuticas. El dominio básico de la proteína TAT del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) (RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 20) y variantes más largas) u otros PTD {El-Andaloussi, 2005 N.º 36} tal como poli-arginina (por ejemplo, 8R; RRRRRRRR (SEQ ID NO: 19)) o lisina, se han utilizado para administrar una amplia diversidad de cargas bioactivas en células en cultivo y modelos preclínicos *in vivo* {El-Andaloussi, 2005 N.º 36; Goun, 2006 N.º 38; Meade, 2007 N.º 37}. Muchos grupos han demostrado la administración eficiente de cargas de péptidos, ácidos nucleicos y moléculas grandes por parte de los PTD y actualmente se están realizando varios ensayos clínicos utilizando la administración mediada por PTD. Se han realizado muchos estudios mecánicos sobre la captación del PTD con el mecanismo preciso aún poco definido {Fischer, 2005 N.º 41; Gump, 2007 N.º 39; Nakase, 2008 N.º 40; Heitz, 2009 N.º 42; Gump, 2010 N.º 2}.

Se entiende que las cargas fusionadas con PTD se translocan a través de la membrana celular y su concentración extracelular dicta la eficiencia de la administración. Estudios recientes han demostrado que la administración de proteínas mediada por PTD está mediada por vías endocíticas, tal como la macropinocitosis dependiente de balsas lipídicas {Gump, 2010 N.º 2}. Después de la internalización por macropinocitosis, las cargas de proteínas están contenidas dentro de los macropinosomas y no están libres dentro del citosol; restringiendo la correcta localización y actividad. Las vesículas macropinocíticas se consideran endosomas con fugas en comparación con otros tipos y pierden progresivamente la integridad de la membrana debido a la acidificación. Esto significa que es probable que cualquier escape de proteínas marcadas con PTD se deba a estas propiedades {Norbury, 1995 N.º 21; Meier, 2002 N.º 20}. Es importante destacar que las vesículas macropinocíticas no se fusionan en los lisosomas para degradar su contenido {Conner, 2003 N.º 22}. Sin embargo, la administración requiere grandes excesos de proteínas extracelularmente para impulsar la translocación. Además, deben administrarse cantidades significativas para lograr una cantidad eficaz para escapar de la retención endosómica y que sea biológicamente funcional. Se han

desarrollado diversas técnicas para estimular la liberación de carga de estas vesículas, incluyendo ultrasonidos, tratamiento conjunto con péptidos disruptores del endosoma o tratamientos químicos, tal como cloroquina, contra las vías endosómicas {Gump, 2007 N.º 39}. La administración conjunta de los disruptores endosómicos es atractiva, ya que estos péptidos podrían administrarse directamente con cargas {Wadia, 2004 N.º 25}, sin embargo, la eficacia de este proceso aún deja a la gran mayoría de proteínas atrapadas lejos del citosol {Skehel, 2001 N.º 34; Han, 2001 N.º 35}. Por lo tanto, la posibilidad de transducir directamente la célula con cantidades suficientes de proteína, por ejemplo, para tener efectos de expresión metabólicos o fisiológicos en las células, no ha sido una opción práctica hasta ahora.

- 10 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método mejorado de transducción de carga para proporcionar efectos fisiológicos o metabólicos en la célula.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona una molécula de administración para la transducción de una carga en una célula de acuerdo con la reivindicación 1 descrita en el presente documento. Ventajosamente, Ventajosamente, la provisión de la molécula de administración de la presente invención puede aumentar la eficiencia de la transducción de una carga en las células, tales como células madre. En algunos ejemplos, se ha demostrado una mejora >100 veces mayor en la cantidad de administración en comparación con cualquier sistema conocido existente. El elemento de unión a GAG, tal como el elemento de unión a HS-GAG P21 (de un factor de crecimiento), en combinación con un dominio de transducción de proteínas, tal como el péptido arginina 8mer, y una carga, facilita enormemente la captación de grandes cantidades de carga en las células, tales como células de mamífero. Las células no solo absorben la molécula de administración (por macro-pinocitosis), sino que también se ha demostrado que las moléculas de administración atraviesan la matriz celular y se administran al núcleo. Este procedimiento es más eficaz que la administración a base de ADN de proteínas y la carga se administra a sitios donde se desea la actividad (incluido el núcleo). También pueden conseguirse respuestas específicas de las células.

Esta tecnología proporciona un cambio gradual no solo en lo que hasta ahora se ha limitado a los experimentos transgénicos, sino que también establece el escenario para el uso terapéutico de iPSC (células madre pluripotentes inducidas), donde las iPSCs ya no necesitan ser modificadas con construcciones de ADN.

- 30 Ventajosamente, proporcionar una molécula de unión a carga proporciona una molécula que está funcionalizada para unirse y transportar una amplia gama de cargas a través de la membrana celular.

El sistema de administración de moléculas de la invención en el presente documento puede denominarse GET (transducción mejorada de unión a GAG) o, de otro modo, administración mediada por el dominio de transducción mejorada con sulfato de heparán (HETD). Estos términos pueden usarse indistintamente.

El elemento de unión a GAG puede ser un elemento de unión a sulfato de heparán-glucosaminoglicano (HS-GAG), que es capaz de unirse a HS-GAG en la superficie de la célula.

- 40 El sulfato de heparán-glucosaminoglicano (HS-GAG) es un proteoglicano en el que dos o tres cadenas de HS se unen muy cerca de la superficie celular o de las proteínas de la matriz extracelular. Es en esta forma que HS se une a una diversidad de ligandos proteicos y regula una amplia diversidad de actividades biológicas, incluyendo procesos de desarrollo, angiogénesis, coagulación sanguínea y metástasis tumoral. El sulfato de heparán es miembro de la familia de glucosaminoglicanos de carbohidratos y está muy relacionado en estructura con la heparina. Ambos consisten en una unidad de disacáridos de repetición sulfatada de forma variable. La unidad de disacáridos más común dentro del sulfato de heparán está compuesta por un ácido glucurónico (GlcA) unido a la N-acetilglucosamina (GlcNAc) que típicamente constituye aproximadamente el 50 % del total de unidades de disacáridos.

El elemento de unión a GAG puede tener afinidad específica por GAG. El elemento de unión a HS-GAG puede tener afinidad específica por HS-GAG. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender un dominio de unión a heparina (HBD), o una variante del mismo. La variante del dominio de unión a heparina puede comprender un dominio de unión a heparina truncado, o un dominio de unión a heparina extendido. El elemento de unión a GAG puede comprender cualquier proteína, péptido o molécula que se una a GAG de manera específica o preferente. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender cualquier proteína, péptido o molécula que se una específicamente o preferiblemente a HS-GAG.

El elemento de unión a HS-GAG puede comprender al menos parte del dominio de unión a heparina del factor de crecimiento de tipo EGF de unión a heparina (HB-EGF). El dominio de unión a heparina puede comprender P21 de HB-EGF. El dominio de unión a heparina puede comprender una variante truncada, extendida o funcional de P21.

El elemento de unión a HS-GAG puede comprender un dominio de unión a heparina de un factor de crecimiento de fibroblastos, o una parte funcional o variante del mismo.

El elemento de unión a HS-GAG puede seleccionarse de cualquiera de los grupos que comprenden FGF, antitrombina, tal como ATIII, VEGF, BMP, Wnts, Shh EGF, y PDGF; o variantes de los mismos. El elemento de unión HS-GAG puede comprender cualquiera de FGF2, FGF7, o PDGF. El elemento de unión a HS-GAG puede

- comprender uno o más de los dominios de sulfato de unión a heparán de cualquier proteína de FGF (por ejemplo, los dominios A, B o C). El elemento de unión HS-GAG puede comprender FGF4. El elemento de unión HS-GAG puede comprender FGF1 HBD A (dominio de unión a sulfato de heparán A (el primer dominio HBD de FGF1)), FGF2 HBD A (dominio de unión a sulfato de heparán A), FGF4 HBD A (dominio de unión a sulfato de heparán A), FGF1 HBD C (dominio de unión a sulfato de heparán C), FGF2 HBD B (dominio de unión a sulfato de heparán B), FGF2 HBD C (dominio de unión a sulfato de heparán C), FGF4 HBD C (dominio de unión a sulfato de heparán C), FGF7 HBD B (dominio de unión a sulfato de heparán B), FGF7 HBD C (dominio de unión a sulfato de heparán C), antitrombina, tal como ATIII, VEGF, o PDGF, o variantes de los mismos.
- El elemento de unión a HS-GAG puede seleccionarse de cualquiera de los grupos que comprenden factor de crecimiento de hepatocitos, interleucina, morfógenos, enzimas de unión a HS-GAG, Wnt/Wingless, endostatina, proteína viral, tal como proteína del virus de la fiebre aftosa, anexina V, lipoproteína lipasa; o fragmentos de unión a HS-GAG de los mismos. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender cualquier proteína, péptido o molécula capaz de unirse específicamente a HS-GAG.
- El experto en la técnica puede entender que una "variante" incluye una variante funcional, en la que puede haber algunas diferencias de secuencia de la secuencia conocida, informada, divulgada o reivindicada, pero la variante aún puede unirse a HS-GAG. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos también se contemplan dentro del significado de "variante".
- El elemento de unión a HS-GAG puede comprender la secuencia de aminoácidos KRKKKGKGLGKKRDPCLRKYK (P21) SEQ ID NO. 1). El elemento de unión a HS-GAG puede comprender una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEQ ID NO. 1. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO. 1. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO. 1. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender una secuencia que tiene al menos un 98 % de identidad con la SEQ ID NO. 1. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender una secuencia que tiene al menos un 99 % de identidad con la SEQ ID NO. 1.
- El elemento de unión a HS-GAG puede comprender la secuencia de aminoácidos G R P R E S G KKRKRRLKPT (PDGF, SEQ ID NO. 3). El elemento de unión a HS-GAG puede comprender una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEQ ID NO. 3. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO. 3. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO. 3. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender una secuencia que tiene al menos un 98 % de identidad con la SEQ ID NO. 3. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender una secuencia que tiene al menos un 99 % de identidad con la SEQ ID NO. 3.
- El elemento de unión a HS-GAG puede comprender la secuencia de aminoácidos T Y A S A K W THNGGEMFVALNQ ((FGF7, HBD B) SEQ ID NO. 5). El elemento de unión a HS-GAG puede comprender una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEQ ID NO. 5. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO. 5. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO. 5. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender una secuencia que tiene al menos un 98 % de identidad con la SEQ ID NO. 5. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender una secuencia que tiene al menos un 99 % de identidad con la SEQ ID NO. 5.
- El elemento de unión a HS-GAG puede comprender la secuencia de aminoácidos T Y R S R K Y TSWYVALKR (FGF2 HBD B SEQ ID NO. 7). El elemento de unión a HS-GAG puede comprender una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEQ ID NO. 7. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO. 7. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO. 7. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender una secuencia que tiene al menos un 98 % de identidad con la SEQ ID NO. 7. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender una secuencia que tiene al menos un 99 % de identidad con la SEQ ID NO. 7.
- La identidad de secuencia se puede determinar por los parámetros de alineamiento estándar de BLAST (proporcionados por <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
- El elemento de unión a GAG puede comprender un anticuerpo de unión a GAG, o una variante o fragmento del mismo. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender un anticuerpo de unión a HS-GAG, o una variante o fragmento del mismo. El fragmento de anticuerpo puede ser un dominio variable de anticuerpo, un scFv, un diacuerpo, un FAb, un Dab, un F(ab)'2, un dímero de cadena pesada o una estructura monocatenaria. La variante de anticuerpo puede comprender un andamiaje proteico que comprende CDR, un mimético de anticuerpo, o un DARPIn.
- El elemento de unión a GAG o HS-GAG puede comprender un nanocuerpo (fragmentos de unión a antígeno de dominio único derivados de anticuerpos de cadena pesada que están desprovistos de cadenas ligeras y que se

producen naturalmente en Camelidae).

El anticuerpo de dominio único puede comprender un fragmento V_HH que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3, en el que

- 5 CDR1 puede comprender o consiste en la secuencia de aminoácidos de GFTVSSNE (SEQ ID NO: 21) o GFAFSSYA (SEQ ID NO: 22);
 CDR2 puede comprender o consiste en la secuencia de aminoácidos de ISGGST (SEQ ID NO: 23) o IGTGGDT (SEQ ID NO: 24); y
 10 CDR3 puede comprender o consiste en la secuencia de aminoácidos de GRRLKD (SEQ ID NO: 25) o SLRMNGWRAHQ (SEQ ID NO: 26).

El anticuerpo de dominio único puede comprender un fragmento V_HH que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3, en el que

- 15 CDR1 puede comprender o consiste en la secuencia de aminoácidos de GFTVSSNE (SEQ ID NO: 21);
 CDR2 puede comprender o consiste en la secuencia de aminoácidos de ISGGST (SEQ ID NO: 23); y
 CDR3 puede comprender o consiste en la secuencia de aminoácidos de GRRLKD (SEQ ID NO: 25).

Como alternativa, la CDR3 puede comprender la secuencia de aminoácidos GMRPRL (SEQ ID NO: 27), HAPLRNTRTNT (SEQ ID NO: 28), GSRSSR (SEQ ID NO: 29), GRTVGRN (SEQ ID NO: 30), GKVKLPN (SEQ ID NO: 31), SGRKGRMR (SEQ ID NO: 32), SLRMNGWRAHQ (SEQ ID NO: 26), o RRYALDY (SEQ ID NO: 33).

El anticuerpo de dominio único puede comprender un fragmento V_HH que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3, en el que

- 25 CDR1 puede comprender o consiste en la secuencia de aminoácidos de GFAFSSYA (SEQ ID NO: 22);
 CDR2 puede comprender o consiste en la secuencia de aminoácidos de IGTGGDT (SEQ ID NO: 24); y
 CDR3 puede comprender o consiste en la secuencia de aminoácidos de SLRMNGWRAHQ (SEQ ID NO: 26).

Como alternativa, la CDR3 puede comprender la secuencia de aminoácidos LKQQGIS (SEQ ID NO: 34), AMTQKKPRKLSL (SEQ ID NO: 35), HAPLRNTRTNT (SEQ ID NO: 28), GMRPRL (SEQ ID NO: 27), RRYALDY (SEQ ID NO: 33), o SGRKYFRARDMN (SEQ ID NO: 36).

El elemento de unión a HS-GAG puede comprender anticuerpos scFv anti-HS AO4B08, AO4B05, A04F12, RB4CB9, RB4CD12, RB4EA12, o RB4EG12 (como se describe en Jenniskens *et al* (2000. *The Journal of Neuroscience*, 20(11):4099-4111) y Smits, *et al* (2006. *METHODS IN ENZYMOLOGY*, VOL. 416, págs. 61-87); o fragmentos de los mismos. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender AO4B08. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender la CDR1, CDR2 y CDR3 de AO4B08, AO4B05, A04F12, RB4CB9, RB4CD12, RB4EA12, o RB4EG12. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender la CDR1, CDR2 y CDR3 de AO4B08.

El elemento de unión a HS-GAG puede comprender HS3A8, LKIV69, EW3D10, EW4G2, NS4F5, RB4EA12, HS4E4 o HS4C3 (como se describe en Wijnhoven *et al* (2008) *Glycoconj J* 25:177-185) y Smits, *et al* (2006. *METHODS IN ENZYMOLOGY*, VOL. 416, págs. 61-87). El elemento de unión a HS-GAG puede comprender HS4E4 o HS4C3. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender la CDR1, CDR2 y CDR3 de HS3A8, LKIV69, EW3D10, EW4G2, NS4F5, RB4EA12, HS4E4 o HS4C3. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender la CDR1, CDR2 y CDR3 de HS4E4 o HS4C3.

El elemento de unión a HS-GAG puede comprender la SEQ ID NO: 15 o 17 (AO4B08). El elemento de unión a HS-GAG puede comprender la SEQ ID NO: 11 o 13 (HS4C3). El elemento de unión a HS-GAG puede comprender un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de cadena pesada y/o cadena ligera. El elemento de unión a HS-GAG puede comprender un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de cadena pesada, que comprende las cadenas HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y/o de cadena ligera, que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3.

El dominio de transducción de proteínas puede ser hidrófilo o anfifílico. El dominio de transducción de proteínas puede comprender una mayoría de residuos de aminoácidos hidrófilos. El dominio de transducción de proteínas puede comprender una mayoría de residuos de aminoácidos de arginina y/o lisina. El dominio de transducción de proteínas puede comprender una secuencia periódica, que tiene un motivo de secuencia de aminoácidos repetido. El dominio de transducción de proteínas puede comprender penetratina, TAT tal como TAT derivado de VIH, MAP, o transportán, pVec, o pep-1.

Cuando se hace referencia a una "mayoría" de residuo, el experto en la técnica puede entender que incluye más del 50 % de los residuos. Una mayoría puede ser del 55 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o el 95 % de los residuos.

El dominio de transducción de proteínas puede seleccionarse de cualquiera de los grupos que comprenden:

- Penetratina o Antenapedia PTD RQIKWFFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 37);
 TAT YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 38);
 65 SynB1 RGGRLSYRRRFSTSTGR (SEQ ID NO: 39);
 SynB3 RRLSYRRRF (SEQ ID NO: 40);

PTD-4 PIRRRKLRRLK (SEQ ID NO: 41);
 PTD-5 RRQRRTSKLMKR (SEQ ID NO: 42);
 FHV Coat-(35-49) RRRNRTRNRNRVR (SEQ ID NO: 43);
 BMV Gag-(7-25) KMTRAQRRAARRNRWTAR (SEQ ID NO: 44);
 HTLV-II Rex-(4-16) TRRQRTRRRARNR (SEQ ID NO: 45);
 D-Tat GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 46);
 R9-Tat GRRRRRRRRRPPQ (SEQ ID NO: 47);

Quimera Transportán GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 48);
 MAP KLALKLALKLALALKLA (SEQ ID NO: 49);
 SBP MGLGLHLLVLAALQGAWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 50);
 FBP GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 51);
 MPG ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV-cya (SEQ ID NO: 52);
 MPG(?NLS) ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV-cya (SEQ ID NO: 53);
 Pep-1 ac-KETWWETWWTEWSQPKKKRKV-cya (SEQ ID NO: 54); y
 Pep-2 ac-KETWFETWFTEWSQPKKKRKV-cya (SEQ ID NO: 55).

El dominio de transducción de proteínas puede comprender poliargininas, tales como quimera RxN (4<N<17), polilisinas, tales como quimera KxN (4<N<17), (RAcA)6R, (RABu)6R, (RG)6R, (RM)6R, (RT)6R. (RS)6R, R10, (RA)6R, R7, o R8.

El dominio de transducción de proteínas puede comprender poliarginina o polilisina. El dominio de transducción de proteínas puede comprender una secuencia de repetición de arginina y lisina. El dominio de transducción de proteínas puede comprender residuos de arginina, tales como residuos de arginina consecutivos. El dominio de transducción de proteínas puede consistir esencialmente en residuos de arginina. El dominio de transducción de proteínas puede comprender repeticiones de arginina, tales como 4-20 residuos de arginina. El dominio de transducción de proteínas puede comprender 8 residuos de arginina. El dominio de transducción de proteínas puede comprender entre aproximadamente 6 y aproximadamente 12 residuos de arginina. El dominio de transducción de proteínas puede comprender entre aproximadamente 7 y aproximadamente 9 residuos de arginina.

El dominio de transducción de proteínas puede comprender entre aproximadamente 4 y aproximadamente 12 residuos de aminoácidos. El dominio de transducción de proteínas puede comprender entre aproximadamente 6 y aproximadamente 12 residuos de aminoácidos. El dominio de transducción de proteínas puede comprender entre aproximadamente 7 y aproximadamente 9 residuos de aminoácidos. El dominio de transducción de proteínas puede comprender al menos aproximadamente 4 residuos de aminoácidos. El dominio de transducción de proteínas puede comprender al menos aproximadamente 6 residuos de aminoácidos.

El dominio de transducción de proteínas puede comprender residuos de lisina, tales como residuos de lisina consecutivos. El dominio de transducción de proteínas puede consistir esencialmente en residuos de lisina. El dominio de transducción de proteínas puede comprender repeticiones de lisina, tales como 4-20 residuos de lisina. El dominio de transducción de proteínas puede comprender 8 residuos de lisina. El dominio de transducción de proteínas puede comprender entre aproximadamente 4 y aproximadamente 12 residuos de lisina. El dominio de transducción de proteínas puede comprender entre aproximadamente 6 y aproximadamente 12 residuos de lisina. El dominio de transducción de proteínas puede comprender entre aproximadamente 7 y aproximadamente 9 residuos de lisina.

El dominio de transducción de proteínas puede comprender residuos de Q y R, tales como residuos de repetición de QR consecutivos. El dominio de transducción de proteínas puede consistir esencialmente en residuos de Q y R. El dominio de transducción de proteínas puede comprender repeticiones de QR, tales como 4-20 residuos de repetición de QR. El dominio de transducción de proteínas puede comprender 8 residuos de repetición de QR. El dominio de transducción de proteínas puede comprender entre aproximadamente 6 y aproximadamente 12 residuos de repetición de QR. El dominio de transducción de proteínas puede comprender entre aproximadamente 7 y aproximadamente 9 residuos de repetición de QR.

La carga puede ser una carga molecular. La carga puede comprender una proteína. La carga puede comprender un péptido. La carga puede comprender una molécula no pequeña. La carga puede comprender una nanopartícula, tal como una nanopartícula de metal o una nanopartícula de polímero. La nanopartícula puede ser una varilla, como una varilla metálica. La nano-partícula puede ser porosa. La carga puede comprender una nanoestructura. La carga puede comprender una nanopartícula superparamagnética de óxido de hierro (SPION). La carga puede comprender ácido nucleico, tal como un vector de ácido nucleico. La carga puede comprender un oligonucleótido. La carga puede comprender cualquiera de ARNs, ARN mensajeros modificados (ARNm), micro ARN, ADN, PNA, LNA o construcciones de los mismos.

La carga puede comprender una proteína fisiológica o metabólicamente relevante. La carga puede comprender una proteína intracelular. La carga puede comprender una proteína de señal, que es una proteína involucrada en una ruta de señal. La carga puede comprender una proteína involucrada en la regulación de la expresión o el

metabolismo de una célula. La carga puede comprender una proteína involucrada en la división celular. La carga puede comprender una proteína involucrada en la diferenciación celular, tal como la diferenciación de células madre. La carga puede comprender una proteína requerida para la inducción de células madre pluripotentes. La carga puede comprender una proteína involucrada en la diferenciación de las células cardíacas. La carga puede comprender un marcador, tal como un marcador de proteína. La carga puede comprender una proteína bacteriana o derivada de bacterias. La carga puede comprender una proteína derivada de mamífero, o de mamífero. La carga puede ser cualquier péptido, polipéptido o proteína. La carga puede comprender moléculas de investigación, de diagnóstico o terapéuticas. La carga puede comprender un modulador de transcripción, un miembro de la producción de señales. La carga puede comprender una enzima o sustrato de la misma, una proteasa, un modulador de la actividad enzimática, un perturbador y un aptámero peptídico, un anticuerpo, un modulador de la interacción proteína-proteína, un factor de crecimiento, o un factor de diferenciación.

La carga puede ser una pre-proteína. Por ejemplo, pueden proporcionarse dominios de escisión en la molécula de administración, que se dispone para escindirse tras la entrada o después de la entrada en la célula. La carga puede ser una proteína dispuesta para ser modificada postraduccionalmente dentro de la célula. La carga puede estar dispuesta para ser funcional una vez dentro de la célula. Por ejemplo, la carga puede no ser funcional hasta después de la transducción en la célula.

La carga puede comprender cualquier molécula intracelular. La carga puede comprender cualquier proteína o molécula que tenga una función intracelular (modo de acción), receptor intracelular, ligando intracelular o sustrato intracelular. La carga puede comprender una proteína o molécula que se internaliza de forma natural/normal en una célula. La carga puede comprender una proteína destinada a la administración o visualización en la superficie celular, tal como un receptor de la superficie celular. La carga puede seleccionarse de cualquiera de los grupos que comprenden una molécula terapéutica; un fármaco; un profármaco; una proteína o péptido funcional, tal como una enzima o un factor de transcripción; una proteína o péptido microbiano; y una toxina; o ácido nucleico que codifica los mismos.

La carga puede seleccionarse de cualquiera de los grupos que comprenden NANOG, NEO, MYOD, Cre, GATA4, TBX5, BAF60c y NKX2.5. La carga puede comprender RFP. La carga puede comprender Cre. La carga puede comprender un miembro de la red reguladora de genes cardíacos. La carga puede comprender GATA4. La carga puede comprender TBX5. La carga puede comprender NKX2.5. La carga puede comprender BAF60c. La carga puede comprender Oct-3/4 (Pou5fl), Sox2, Lin28, Klf4, Nanog, Glis1 o c-Myc; o combinaciones de los mismos.

La carga puede seleccionarse de cualquiera de los grupos que comprenden toxina, factores de transcripción hormonales, tales como jun, fos, max, mad, factor de respuesta sérica (SRF), AP-1, AP2, myb, MyoD, miogenina, proteínas que contienen caja ETS, TFE3, E2F, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF4, C/EBP, SP1, proteínas de unión a caja CCAAT, factor de regulación de interferón (IRF-1), proteína del tumor de Wilms, proteína de unión a ETS, STAT, proteínas de unión a caja GATA, por ejemplo, GATA-3, factor de transcripción, tales como HIF1a y RUNT, la familia forkhead de proteínas de hélice aladas, carbamoil sintetasa I, ornitina transcarbamilasa, arginosuccinato sintetasa, arginosuccinato liasa, arginasa, fumarilacetacetato hidrolasa, fenilalanina hidroxilasa, alfa-1 antitripsina, glucosa-6-fosfatasa, porfobilinógeno desaminasa, factor VIII, factor IX, cistationa beta-sintasa, cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada, isovaleril-CoA deshidrogenasa, propionil CoA carboxilasa, metil malonil CoA mutasa, glutaril CoA deshidrogenasa, beta-glucosidasa, carboxilato de piruvato, fosforilasa hepática, fosforilasa cinasa, glicina descarboxilasa, proteína H, proteína T, una secuencia del regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), una secuencia de ADNc de distrofina, Oct-3/4 (Pou5fl), Sox2, c-Myc, Klf4, RPE65 Nanog, y SoxB1; o fragmentos de los mismos, y/o combinaciones de los mismos.

La carga puede comprender complejos unidos no covalentemente, tales como complejos proteína-proteína, proteína-ARNm, proteína-ARN no codificante, proteína-lípido y proteína-complejos de molécula pequeña. Los ejemplos de dichos complejos son RISC y espliceosomas.

La carga puede tener un peso molecular de al menos 1 KDa. La carga puede tener un peso molecular de al menos 5 KDa. La carga puede tener un peso molecular de al menos 10 KDa. La carga puede tener un peso molecular de al menos 20 KDa. La carga puede tener un peso molecular de 400 KDa o menos. La carga puede tener un peso molecular de 300 KDa o menos. La carga puede tener un peso molecular de entre aproximadamente 0,5 KDa y aproximadamente 400 kDa. La carga puede tener un peso molecular de entre aproximadamente 1 KDa y aproximadamente 400 kDa. La carga puede tener un peso molecular de entre aproximadamente 0,5 KDa y aproximadamente 200 kDa. La carga puede tener un peso molecular de entre aproximadamente 1 KDa y aproximadamente 200 kDa. La carga puede tener un peso molecular de entre aproximadamente 2 KDa y aproximadamente 300 kDa. La carga puede tener un peso molecular de entre aproximadamente 20 KDa y aproximadamente 300 kDa. La carga puede tener un peso molecular de entre aproximadamente 20 KDa y aproximadamente 100 kDa.

Cuando la carga comprende aminoácidos, la carga puede tener entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30.000 aminoácidos de longitud. La carga puede tener entre aproximadamente 20 y aproximadamente 10.000 aminoácidos de longitud. La carga puede tener entre aproximadamente 20 y aproximadamente 5.000 aminoácidos

de longitud. La carga puede tener entre aproximadamente 20 y aproximadamente 1000 aminoácidos de longitud. La carga puede tener al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud. La carga puede tener al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud.

- 5 La carga puede ser capaz de unirse, tal como la unión iónica o covalente, a la molécula de unión a la carga. La carga puede ser capaz de unirse, tal como la unión iónica o covalente, al dominio de transducción de proteínas y/o al elemento de unión a GAG.

- 10 La carga puede comprender un elemento para unirse a la molécula de unión a la carga. La carga puede comprender biotina, o como alternativa, estreptavidina. La carga puede ser biotinilada. La carga puede comprender una etiqueta de afinidad capaz de unirse a una etiqueta de afinidad complementaria en la molécula de unión a la carga.

- 15 En una realización, la carga está unida a la molécula de unión a la carga. La carga puede estar unida a la molécula de unión a la carga durante la fabricación de la molécula de administración, posterior a la fabricación, antes del uso o durante el uso.

- 20 La molécula de unión a carga puede ser un vehículo para la molécula de carga. Una sola molécula de unión a la carga puede unirse y transportar múltiples moléculas de carga. La molécula de unión a la carga puede proteger la carga antes de la internalización en una célula. La molécula de unión a la carga puede ser capaz de unirse a la biotina en una carga biotinilada. La molécula de unión a la carga puede ser capaz de unirse a la carga a base de ácido nucleico. La molécula de unión a la carga puede ser capaz de unirse a una carga a base de péptidos. La molécula de unión a la carga puede ser capaz de unirse a una carga de anticuerpo, o fragmento o mimético de la misma. La molécula de unión a la carga puede ser capaz de unirse a una carga de nanopartículas, tal como una nanopartícula de metal o polímero. La molécula de unión a la carga puede estar funcionalmente inactiva en una
- 25 célula, pero puede transportar o unirse a una carga activa. La molécula de unión a la carga puede comprender una molécula enlazadora química. La molécula de unión a la carga puede comprender una etiqueta de afinidad. La molécula de unión a la carga puede comprender un péptido o proteína. La molécula de unión a la carga puede comprender mSA2 (estreptavidina 2 monomérica). La molécula de unión a la carga puede comprender un péptido que interactúa con el ácido nucleico, tal como LK15. La molécula de unión a la carga puede comprender una
- 30 molécula de unión a anticuerpo, tal como una proteína de unión a IgG. La proteína de unión a IgG puede comprender la proteína de unión a IgG de *S. aureus* SpAB. El experto entenderá que cualquier par o grupo de moléculas adecuado puede usarse para la carga y la molécula de unión a la carga, siempre que tengan una unión o afinidad suficiente entre sí.

- 35 La unión o interacción entre la carga y la molécula de unión a la carga puede ser reversible o degradable, por ejemplo, en el entorno intracelular.

- 40 El elemento de unión a GAG y el dominio de transducción de proteínas pueden unirse a la carga y/o la molécula de unión a la carga mediante conjugación química directa o a través de una molécula enlazadora. El elemento de unión a GAG y el dominio de transducción de proteínas pueden unirse a la carga mediante conjugación química directa o a través de una molécula enlazadora. El elemento de unión a GAG y el dominio de transducción de proteínas pueden unirse a la molécula de unión a la carga mediante conjugación química directa o a través de una molécula enlazadora. El elemento de unión a GAG, el dominio de transducción de proteínas y la carga pueden ser una única molécula de fusión (por ejemplo, puede codificarse y transcribirse como una única molécula peptídica). El elemento
- 45 de unión a GAG, el dominio de transducción de proteínas y la molécula de unión a la carga pueden ser una única molécula de fusión (por ejemplo, puede codificarse y transcribirse como una única molécula peptídica). El dominio de transducción de proteínas y el elemento de unión a GAG pueden flanquear la molécula de unión a la carga y/o la carga.

- 50 La molécula de administración puede tener entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30.000 aminoácidos de longitud. La molécula de administración puede tener entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30.000 aminoácidos de longitud. La molécula de administración puede tener entre aproximadamente 30 y aproximadamente 30.000 aminoácidos de longitud. La molécula de administración puede tener entre aproximadamente 40 y aproximadamente 30.000 aminoácidos de longitud. La molécula de administración puede tener entre
- 55 aproximadamente 10 y aproximadamente 10.000 aminoácidos de longitud. La molécula de administración puede tener entre aproximadamente 20 y aproximadamente 10.000 aminoácidos de longitud. La molécula de administración puede tener entre aproximadamente 40 y aproximadamente 10.000 aminoácidos de longitud. La molécula de administración puede tener entre aproximadamente 10 y aproximadamente 3.000 aminoácidos de longitud. La molécula de administración puede tener entre aproximadamente 20 y aproximadamente 3.000
- 60 aminoácidos de longitud. La molécula de administración puede tener entre aproximadamente 40 y aproximadamente 3.000 aminoácidos de longitud. La molécula de administración puede tener entre aproximadamente 10 y aproximadamente 1000 aminoácidos de longitud. La molécula de administración puede tener entre aproximadamente 20 y aproximadamente 1000 aminoácidos de longitud. La molécula de administración puede tener entre aproximadamente 40 y aproximadamente 1000 aminoácidos de longitud. La molécula de administración puede tener
- 65 entre aproximadamente 40 y aproximadamente 500 aminoácidos de longitud. La molécula de administración puede tener entre aproximadamente 10 y aproximadamente 500 aminoácidos de longitud. La molécula de

administración puede tener entre aproximadamente 20 y aproximadamente 500 aminoácidos de longitud. La molécula de administración puede tener entre aproximadamente 100 y aproximadamente 3.000 aminoácidos de longitud. La molécula de administración puede tener al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud.

5 La molécula de administración puede ser una única molécula de fusión. La carga, el elemento de unión a HS-GAG y el dominio de transducción de proteínas se pueden fusionar. El elemento de unión a HS-GAG y el dominio de transducción de proteínas pueden flanquear la carga. La carga, el elemento de unión a HS-GAG y el dominio de transducción de proteínas pueden estar unidos por una o más moléculas enlazadoras.

10 La molécula de administración puede tener un peso molecular de al menos 1 KDa. La molécula de administración puede tener un peso molecular de al menos 5 KDa. La molécula de administración puede tener un peso molecular de al menos 10 KDa. La molécula de administración puede tener un peso molecular de al menos 20 KDa. La molécula de administración puede tener un peso molecular de 400 KDa o menos. La molécula de administración puede tener un peso molecular de 300 KDa o menos. La molécula de administración puede tener un peso molecular de entre aproximadamente 0,5 KDa y aproximadamente 400 kDa. La molécula de administración puede tener un peso molecular de entre aproximadamente 1 KDa y aproximadamente 400 kDa. La molécula de administración puede tener un peso molecular de entre aproximadamente 0,5 KDa y aproximadamente 200 kDa. La molécula de administración puede tener un peso molecular de entre aproximadamente 1 KDa y aproximadamente 200 kDa. La molécula de administración puede tener un peso molecular de entre aproximadamente 2 KDa y aproximadamente 300 kDa. La molécula de administración puede tener un peso molecular de entre aproximadamente 20 KDa y aproximadamente 300 kDa. La molécula de administración puede tener un peso molecular de entre aproximadamente 20 KDa y aproximadamente 100 kDa.

25 La célula puede ser una célula de mamífero, tal como una célula humana. La célula puede ser una célula cancerosa. La célula puede ser una célula madre. La célula puede ser una célula mutante. La célula puede comprender una población de células. La población de células puede ser una población mixta de tipos de células. La célula puede ser una célula madre mesenquimatosas. La célula puede ser una célula madre embrionaria. La célula puede ser una célula madre pluripotente. La célula puede ser una célula que requiera restauración funcional. La célula puede ser una célula madre cardíaca. La célula puede seleccionarse de cualquiera de los grupos que comprenden NIH3T3, CGR8 y HUES7.

La molécula de administración puede comprender un marcador para identificar y/o rastrear la ubicación de la molécula de administración. El marcador puede comprender un marcador de fluorescencia, o un radioisótopo. El marcador puede comprender mRFP1 (proteína fluorescente roja monomérica). El marcador puede comprender mNectarine, tal como mNectarine sensible al pH. mNectarine, es apropiada para medir cambios fisiológicos de pH en células de mamíferos, porque tiene un pKa' de 6,9. El marcador puede comprender un homólogo de proteína fluorescente roja (RFP) de avGFP. El marcador puede comprender una proteína fluorescente seleccionada de las RFP de la serie mFruit, derivadas de la RFP del discosoma tetramérico. El marcador puede comprender cualquiera de mTangerine, mOrange, mCherry, mStrawberry, citrino FP amarillo. mApple y TagRFP-T. El marcador puede ser sensible al pH. El marcador se puede usar para confirmar la administración de la molécula de administración a la célula o tejido. El marcador puede ser específico del tipo de célula, por ejemplo, el marcador solo puede estar activado o ser fluorescente en tipos de células específicos.

45 La molécula de administración puede comprender una etiqueta para facilitar la purificación, aislamiento, detección y/o determinación de la ubicación. La etiqueta puede ser una etiqueta de afinidad. La etiqueta puede ser un péptido. La etiqueta puede ser un octapéptido FLAG-tag/FLAG.

La molécula de administración puede estar codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 10.

50 Se describe un método para producir una molécula de administración para la transducción que comprende las etapas de:

(i) fusionar una carga con un elemento de unión a GAG, que es capaz de unirse a GAG en la superficie de la célula; y
55 un dominio de transducción de proteínas; o
(ii) combinar el ácido nucleico que codifica una carga con el ácido nucleico que codifica un elemento de unión a GAG y un dominio de transducción de proteínas, y
expresar la molécula de administración a partir del ácido nucleico; o
60 (iii) sintetizar *in vitro* una carga con un elemento de unión a GAG, que es capaz de unirse a GAG en la superficie de la célula; y
un dominio de transducción de proteínas.

65 El ácido nucleico que codifica el elemento de unión a GAG y el dominio de transducción de proteínas puede ser ADN. La síntesis *in vitro* puede comprender la síntesis en fase líquida o sólida del péptido. El elemento de unión a GAG puede ser un elemento de unión a HS-GAG.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para transducir una carga en una célula de acuerdo con la reivindicación 8 en el presente documento.

La transducción puede durar al menos aproximadamente 1 segundo. La transducción puede durar al menos aproximadamente 1 minuto. La transducción puede durar al menos aproximadamente 2 minutos. La transducción puede durar al menos aproximadamente 10 minutos. La transducción puede durar al menos aproximadamente 30 minutos. La transducción puede durar al menos aproximadamente 1 hora. La transducción puede durar 12 hora o menos, tal como 8 horas o menos. La transducción puede durar aproximadamente 6 horas o menos. La transducción puede durar entre aproximadamente 1 hora y 6 horas. La transducción puede durar menos de aproximadamente 1 hora. La transducción puede durar menos de aproximadamente 30 minutos. La transducción puede durar menos de aproximadamente 10 minutos. La transducción puede durar menos de aproximadamente 1 minuto.

Se describe una célula transducida, o inducida, por el método de la invención, o por la molécula de administración de la invención.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una célula de acuerdo con la reivindicación 9 en el presente documento.

La célula puede ser una célula madre pluripotente inducida.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10 en el presente documento.

El ácido nucleico puede ser ADN. El ácido nucleico puede ser un vector.

Se describe un vector para la expresión de una proteína para transducción que comprende

una secuencia que codifica un elemento de unión a GAG, tal como un elemento de unión a HS-GAG; y una secuencia que codifica el dominio de transducción de proteínas.

El vector puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula. El vector puede comprender un elemento de replicación bacteriana, tal como OriP. El vector puede comprender un sitio de restricción/clonación múltiple. El vector puede comprender un promotor fuerte. El vector puede comprender un marcador, tal como un marcador de resistencia a antibióticos.

También se describe una célula que comprende: el ácido nucleico descrito en el presente documento; o un vector descrito en el presente documento.

Se describe un proceso para la producción de una molécula de administración para transducción que comprende:

expresar la molécula de administración a partir de la célula descrita en el presente documento; y aislar o purificar sustancial o parcialmente la molécula de administración.

El aislamiento o la purificación de la molécula de administración puede ser a partir de la célula o células, o del sobrenadante celular. El aislamiento o la purificación de la molécula de administración puede ser a partir de la proteína de la célula huésped (HCP). El experto en la técnica puede aislar o purificar la molécula de administración de la célula mediante cualquier método de purificación estándar.

La molécula de administración puede producirse en una célula, tal como una célula de mamífero, insecto, levadura o bacteriana. La molécula de administración puede producirse en una célula de mamífero. La célula puede ser HeLa, CHO, o HEK293T.

Se describe un método para modificar una carga para mejorar la transducción de la carga en una célula, que comprende la provisión de un elemento de unión a HS-GAG y un dominio de transducción de proteínas unido a la carga.

El elemento de unión a HS-GAG, el dominio de transducción de proteínas y la carga pueden proporcionarse mediante la expresión de proteínas como una única molécula de fusión. El elemento de unión a HS-GAG, el dominio de transducción de proteínas y la carga pueden proporcionarse uniéndolos químicamente entre sí. El enlace químico puede ser un enlace covalente. El elemento de unión a HS-GAG, el dominio de transducción de proteínas y la carga pueden proporcionarse fusionándolos, por ejemplo, utilizando tecnologías de etiqueta SNAP, etiqueta Halo (Promega) o etiqueta CLIP (New England Biolabs).

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de acuerdo con la reivindicación 11 en el presente documento.

También se describe un método de tratamiento o prevención de una enfermedad que comprende administrar una composición que comprende una molécula de administración de acuerdo con la invención.

5 También se describe un método de tratamiento o prevención de una enfermedad que comprende administrar una célula de acuerdo con la invención.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula de administración de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad.

10 La enfermedad puede ser cualquier enfermedad caracterizada por una deficiencia de proteínas en una o más células. La enfermedad puede comprender una afección cardíaca, tal como un trastorno cardíaco. La enfermedad puede comprender una enfermedad tratable o prevenible mediante la administración de células madre diferenciadas. La enfermedad puede comprender una enfermedad tratable o prevenible mediante la administración de células madre pluripotentes inducidas. La enfermedad puede comprender una enfermedad tratable o prevenible por transducción de proteínas. El tratamiento puede comprender la regeneración del tejido del corazón o la restauración de la función del tejido del corazón. La enfermedad puede comprender cáncer o distrofia muscular.

La molécula de administración se puede usar para (a) inhibir la proliferación y/o migración de las células del músculo liso; (b) promover la relajación del músculo liso; (c) aumentar la tasa contráctil en el músculo cardíaco; (d) aumentar la tasa de relajación del músculo cardíaco; (e) promover la cicatrización de heridas; (f) reducir la formación de cicatrices; (g) alterar las adherencias focales; (h) regular de la polimerización de la actina; o (i) tratar, prevenir o inhibir una o más de hiperplasia de la íntima, estenosis, reestenosis, aterosclerosis, tumores de células de músculo liso, espasmos del músculo liso, angina, angina de Prinzmetal (vasoespasmo coronario), isquemia, ictus, bradicardia, hipertensión, hipertensión pulmonar (pulmón), asma (broncoespasmo), toxemia del embarazo, trabajo de parto prematuro, preeclampsia/eclampsia, enfermedad o fenómeno de Raynaud, uremia hemolítica, isquemia mesentérica no oclusiva, fisura anal, acalasia, impotencia, trastorno de interés/excitación sexual femenino (FSAD), migraña, lesión muscular isquémica asociada con espasmo del músculo liso, vasculopatía, tal como vasculopatía por trasplante, bradiarritmia, bradicardia, insuficiencia cardíaca congestiva, miocardio aturdido, hipertensión pulmonar, distrofia muscular, canalopatía y disfunción diastólica.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para modificar la función celular de acuerdo con la reivindicación 13 en el presente documento.

El cultivo de células puede ser *in vitro*.

Se describe un método para inducir la diferenciación de una célula mediante la transducción de una molécula de administración descrita en el presente documento en una célula madre.

La célula madre puede comprender una célula madre cardíaca. La molécula de administración puede comprender GATA4 o TBX5.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para inducir una célula madre pluripotente de acuerdo con la reivindicación 14 en el presente documento. La molécula de administración puede comprender Oct-3/4 (Pou5f1), Sox2, Lin28, Klf4, Nanog, Glis1 o c-Myc; o combinaciones de los mismos.

También se describe un método para inducir la diferenciación cardíaca por transducción de una primera molécula de administración descrita en el presente documento en una célula madre cardíaca, y la transducción de una segunda molécula de administración descrita en el presente documento en la célula madre cardíaca, en el que la primera molécula de administración comprende GATA4 y la segunda molécula de administración comprende TBX5.

El método para inducir la diferenciación cardíaca de una célula madre puede comprender además la transducción de una o más proteínas de fusión que comprenden una carga seleccionada de cualquiera de los grupos que comprenden GATA4, TBX5, NKX2.5, y BAF60c. El método para inducir la diferenciación cardíaca de una célula madre puede comprender además la transducción de una o más proteínas de fusión que comprenden una proteína de la red reguladora del gen cardíaco. La transducción en la célula madre cardíaca puede ser concurrente o secuencial.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15 en el presente documento.

La molécula de administración se puede transducir en presencia de, o coadministrarse con, un agente de liberación de vesículas para promover la liberación de la molécula de administración a partir de vesículas micropinocíticas. El agente de liberación de vesículas puede comprender cloroquina. La concentración de cloroquina puede estar entre aproximadamente 1 μ M y aproximadamente 100 μ M.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula de administración de acuerdo con la presente invención, en la que la carga comprende una nanopartícula, para su uso en imágenes de células de acuerdo con la reivindicación 16 descrita en el presente documento.

5 La nanopartícula puede comprender metal o polímero. La nanopartícula puede ser una varilla.

También se describe un método de terapia génica que comprende la administración de la molécula de administración de acuerdo con la invención en una célula, en la que la carga comprende ácido nucleico.

10 Ventajosamente, la transducción puede monitorizarse, o puede monitorizarse en tiempo real.

La molécula de administración puede estar dispuesta para dirigirse (es decir, administrar carga a) tipos de células específicos. Se puede elegir un elemento de unión a GAG apropiado para dirigirse a una población específica de células que tienen el tipo de GAG correspondiente en la superficie celular.

15 El experto entenderá que las características opcionales de una realización o aspecto de la invención pueden ser aplicables, cuando sea adecuado, a otras realizaciones o aspectos de la invención.

20 Las realizaciones de la invención se describirán ahora con más detalle, a modo de ejemplo únicamente, haciendo referencia a los dibujos adjuntos.

Figura 1 Administración ineficiente de proteínas en células pluripotentes. **(a)** Esquema de las proteínas creadas para determinar la eficiencia de la administración de proteínas. mR es una mRFP solo como una proteína de control poco transducida que representa la transducción de fondo. mR-8R es una mRFP con una fusión C-terminal de ocho residuos de arginina (8R) para promover la transducción. **(b)** mR-8R se transduce eficientemente en las células NIH3t3. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células NIH3t3 tratadas con mR o mR-8R (100 µg/ml) durante doce horas en condiciones de medio estándar. Barra de escala, 100 µm. **(c)** mR-8R se transduce ineficientemente en células madre embrionarias humanas y de ratón (HUES7 y CGR-8, respectivamente), células madre pluripotentes inducidas humanas (IPS2) y la línea celular de cardiomiocitos de ratón HL1. Imágenes de microscopía de fluorescencia de múltiples líneas celulares tratadas con mR-8R (100 µg/ml) durante doce horas en condiciones de medio específico del tipo celular. Barra de escala, 100 µm. **(d)** Análisis de citometría de flujo de las múltiples líneas celulares tratadas con diferentes dosis de mR-8R (0, 1, 5, 10, 20, 50 y 100 µg/ml) durante veinticuatro horas. **(e)** Análisis de citometría de flujo de la dosis de 100 µg/ml durante veinticuatro horas. Los gráficos muestran unidades relativas de fluorescencia (U.R.F). Las barras de error indican d.e.

Figura 2 P21 mejora la transducción mediada por PTD. **(a)** Esquema de las proteínas creadas después de seleccionar dominios que mejoran la eficiencia de la administración de proteínas a las células. mR y mR-8R se describen en la Figura 1. P21-mR es una mRFP con una fusión N-terminal del dominio P21 de EGF de unión a heparina (HB-EGF). P21-mR-8R es una mRFP con una fusión N-terminal de P21 y una fusión C-terminal de 8R. **(b)** La fusión de P21 a mR-8R mejora significativamente la transducción en las células NIH3t3. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células NIH3t3 tratadas con proteínas (20 µg/ml) durante doce horas en condiciones de medio estándar. Barra de escala, 100 µm. **(c)** P21-mR-8R se transduce de manera eficiente en células madre embrionarias humanas y de ratón (HUES7 y CGR-8, respectivamente) y células madre pluripotentes inducidas humanas (IPS2) y en la línea celular de cardiomiocitos de ratón HL1. Análisis de citometría de flujo de las líneas celulares transducidas ineficientemente de mR-8R tratadas con proteínas mR-8R (20 µg/ml) durante doce horas. **(d)** P21-mR-8R inicialmente interactúa fuertemente con las membranas celulares y se transduce progresivamente localizándose perinuclearmente. Imágenes de microscopía de exploración por fluorescencia (superior) y láser confocal (inferior) de células NIH3t3 tratadas con P21-mR-8R (20 µg/ml) durante 1 hora, 1 hora con lavados y 5 horas más de incubación (en medio sin suero) o 6 horas de tratamiento. Las células se preincubaron durante 1 hora en medio sin suero, se transdujeron durante el tiempo deseado en medio sin suero. Barras de escala, 50 µm (superior) y 10 µm (inferior). **(e)** La mejora de la transducción mediada por P21 y 8R se ve afectada por la proteólisis de tripsina. La citometría de flujo analiza las células NIH3t3 tratadas con proteínas (20 µg/ml) durante 1 hora y una incubación de 5 horas más (en medio sin suero), con o sin 10 minutos de pre-digestión con tripsina o tratamiento con una solución de disociación celular no proteolítica (CDS). Las células se preincubaron durante 1 hora en medio sin suero, se trataron con tripsina y se transdujeron durante 1 hora en medio sin suero. **(f)** La interacción de la superficie celular de las proteínas que contienen P21 se interrumpe con el tratamiento con Tritonx100. La citometría de flujo analiza las células NIH3t3 tratadas con proteínas (20 µg/ml) durante 1 hora y una incubación de 5 horas más (en medio sin suero) con 10 min de pretratamiento de PBS o PBS que contiene Tritonx100 al 0,1% (v/v) (Tx100). Las células se preincubaron durante 1 hora en medio sin suero, se trataron con PBS o PBS con Tx100 y se transdujeron durante 1 hora en medio sin suero. Las barras de error indican d.e.

Figura 3 P21 se une directamente a la heparina y HS-GAG de la superficie celular. **(a)** La heparina soluble en medio durante la transducción inhibe la interacción de la membrana celular y la transducción de proteínas que contienen P21. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células CGR-8 tratadas con P21-mR-8R (20 µg/ml)

durante 6 horas en medio sin suero que contiene 0 o 50 µg/ml de heparina. Barra de escala, 100 µm. **(b)** La citometría de flujo analiza las células NIH3t3 tratadas con P21-mR-8R (20 µg/ml) durante 6 horas con o sin una diversidad de GAG (50 µg/ml) en medio sin suero. CS es sulfato de condroitina. Las células se preincubaron durante 1 hora en medio sin suero y se transdujeron durante 6 horas en medio sin suero con o sin GAG. **(c-d)** Solo altas dosis de heparina inhiben la actividad de 8R mientras que la actividad de P21 se inhibe de forma dependiente de la dosis por la heparina en **(c)** las células NIH3t3 y **(d)** las células CGR-8. **(e)** y **(f)** Heparán de superficie celular. Se requiere sulfato de heparán para una administración de proteínas eficiente mediada por P21. El FCS que contiene sulfatos de heparán/heparina inhibe la transducción mediada por P21, pero también puede reemplazar los GAG de la superficie celular y mediar la transducción de P21 en células deficientes para el sulfato de heparán. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células CGR-8 y *EXT1*^{-/-} mESC tratadas con P21-mR-8R (20 µg/ml) durante 6 horas en medio que contiene FCS al 0 o al 20 %. Barra de escala, 100 µm. Las barras de error indican d.e.

Figura 4 Administración nuclear mediada por GET/HETD de Cre Recombinasa. **(a)** Esquema de la construcción creado para marcar la actividad de Cre en las células. La escisión mediada por Cre de una región STOP transcripcional flanqueada por sitios *loxP* induce la expresión constitutiva de eGFP. Pr, promotor; βGal, β-galactosidasa; Neo, Neomicina fosfotransferasa. La línea celular NIH3t3 LSL-eGFP se creó por transfección y selección de células NIH3t3. **(b)** Expresión de eGFP en células NIH3t3 LSP-eGFP no tratadas o aquellas transducidas con lentivirus de SIN Cre. La izquierda muestra la microscopía de fluorescencia y la derecha muestra el histograma de citometría de flujo de la expresión de eGFP. Barra de escala, 50 µm **(c)** Esquema de transducción de prueba de la actividad de Cre en células NIH3t3 LSL-eGFP. Las células se transdujeron con proteínas Cre durante 1 hora, se lavaron y se cultivaron durante 2 días antes de los análisis. **(d-e)** P21-mR-Cre-8R se transduce eficientemente y recombina el ADN. **(d)** Imágenes de microscopía de fluorescencia de NIH3t3 LSL-eGFP transducidas con Cre con la diversidad de dosis. Barra de escala, 50 µm. **(e)** Análisis de citometría de flujo de células NIH3t3 LSL-eGFP transducidas durante 1 hora con mR-Cre, mR-Cre-8R y P21-mR-Cre-8R a una diversidad de dosis (0, 1, 10, 100 y 500 µg/ml), lavadas y cultivadas durante 2 días. El gráfico muestra el % de recombinación (es decir, el % de eGFP+ve de la población celular total). Las barras de error indican d.e.

Figura 5 La administración mediada por GET/HETD de NEO promueve la resistencia a los antibióticos en los fibroblastos embrionarios de ratón. **(a)** Esquema de prueba de la actividad de resistencia a los antibióticos de la NEO transducida (neomicina fosfotransferasa) en células de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF). Las células MEF (300.000) se cultivaron en DMEM que contenía FCS al 10 % (v/v) y P21-mR-NEO-8R (0, 10 o 100 µg/ml) durante 3 días suministrando a diario medio recién preparado. Después, se añadió G-418 al medio durante 3 días más con el suministro diario de medio recién preparado. **(b-e)** P21-mR-NEO-8R rescata las células MEF y NIH3t3 de la selección de G-418 al conferir resistencia a los antibióticos. **(b-c)** P21-mR-NEO-8R mantiene cultivos vivos de MEF bajo la selección de G-418. **(b)** Número de células MEF cuando se complementa con SIN NEO (para sobreexpresar NEO) o se transduce con P21-mR-NEO-8R y se selecciona con G-418 (0, 75, 150 o 300 µg/ml). **(c)** Número de células MEF para la dosis de 150 µg/ml de G-418. Las barras de error indican d.e. **(d-e)** P21-mR-NEO-8R promueve la viabilidad en células MEF y NIH3t3 seleccionadas con G-418. **(d)** Cuantificación del porcentaje de células MEF viables utilizando la tinción con azul de tripano. **(e)** Microscopía de fluorescencia de células NIH3t3 seleccionadas con 150 µg/ml de G-418 evaluadas para determinar su viabilidad utilizando tinción LIVE/DEAD. Barra de escala, 100 µm. Las barras de error indican d.e.

Figura 6 La administración mediada por GET/HETD de NANOG promueve la auto-renovación de células madre embrionarias de ratón. **(a)** Esquema de la actividad de prueba de NANOG transducido en células CGR-8. Las se transdujeron con proteínas P21-mR-NANOG-8R (0, 1, 10 y 50 µg/ml) durante tres días consecutivos (1 pase, división 1:3), se pasaron 1:3 y se colocaron en placas en medio de crecimiento con P21-mR-NANOG-8R pero sin LIF (-LIF). Las células se alimentaron diariamente con medio -LIF que contenía P21-mR-NANOG-8R y se pasaron 1:3 cada 3 días durante 2 pases (un total de 3 pases -LIF). **(b)** P21-mR-NANOG-8R rescata la auto-renovación de mESCs que carece de la dosis de LIF de forma dependiente. Tinción con fosfatasa alcalina (AP) de células CGR-8 tratadas con proteínas P21-mR-NANOG-8R y extracción de LIF. La actividad de AP y la morfología de la colonia se conservan en las células CGR-8 cultivadas en LIF o sin LIF pero complementadas con SIN NANOG (para sobreexpresar NANOG) o transducidas con P21-mR-NANOG-8R. Barra de escala, 100 µm. **(c)** P21-mR-NANOG-8R mantiene la proliferación de mESC sin dosis de LIF de forma dependiente. Porcentaje del número de células CGR-8 cultivadas sin LIF frente a las cultivadas con LIF (% de -LIF/+LIF) en el pase. En cultivos de CGR-8 deficientes en LIF la proliferación se promueve cuando se complementa con SIN NANOG (para sobreexpresar NANOG) o se transduce con P21-mR-NANOG-8R. Las barras de error indican d.e. **(d)** El rescate dependiente de NANOG en cultivos deficientes en LIF genera un perfil de expresión génica de tipo más epiblastico. Análisis de expresión génica relativa de cultivos de CGR-8 deficientes en LIF usando PCR cuantitativa (QPCR). Los cultivos complementados con SIN NANOG (para sobreexpresar NANOG) o transducidos con P21-mR-NANOG-8R tienen una expresión aumentada de *Fgf5*, expresión reducida de *Rex1* y conservan la expresión de *Oct4*. Las barras de error indican s.e.

Figura 7 La administración mediada por GET/HETD de MYOD promueve la diferenciación miogénica de las células madre embrionarias humanas. **(a)** Esquema de prueba de la actividad de diferenciación de MYOD transducida en células HUES7. Las células HUES7 se colocaron en placas sobre plástico gelatinizado y se

cultivaron en DMEM que contenía FCS al 10 % (v/v). Las células se alimentaron a diario con DMEM que contenía FCS al 10 % (v/v) y P21-mR-MYOD-8R (0, 1, 5, 10 o 50 µg/ml) durante 7 días. El medio se cambió a DMEM que contenía de suero de caballo (HS) al 2 % (v/v), insulina recombinante humana y P21-mR-MYOD-8R y se alimentaron a diario durante 3 días. **(b-f)** P21-mR-MYOD-8R impulsa la diferenciación miogénica de células HUES7 a miotubos multinucleados. **(b)** Microscopía óptica de células HUES7 cultivadas bajo el régimen miogénico complementado con SIN MYOD (para sobreexpresar MYOD) o transducidas con P21-mR-MYOD-8R. Los miotubos fusionados alargados y los miocitos individuales se generan con SIN-MYOD o altas dosis de P21-mR-MYOD-8R. Barra de escala, 100 µm. **(c)** Diferenciación miogénica dependiente de MYOD de células madre embrionarias humanas. Análisis de expresión génica relativa de cultivos de HUES7 utilizando PCR cuantitativa (QPCR). Los cultivos complementados con SIN MYOD (para sobreexpresar MYOD) o transducidos con P21-mR-MYOD-8R han aumentado la expresión de *MYOD* endógena y la expresión de *ACTA1* específica del músculo esquelético. Las barras de error indican s.e. **(d-e)** Las células diferenciadas con P21-mR-MYOD-8R están multinucleadas. **(d)** Cuantificación del número medio de núcleos por célula utilizando la tinción PI. Las barras de error indican d.e. **(e)** Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HUES7 diferenciadas con P21-mR-MYOD-8R (50 µg/ml) y teñidas con tinte nuclear DAPI. Barra de escala, 50 µm. **(f)** Las células diferenciadas con P21-mRMYOD-8R son positivas a MIOGENINA. Cuantificación del porcentaje de células positivas a MIOGENINA, mediante etiquetado inmunofluorescente. Las barras de error indican d.e.

Figura 8 Las proteínas PTD se unen a células pluripotentes pero se transducen de forma deficiente. Fluorometría del medio para determinar la proteína fluorescente restante que queda después de la incubación con las células. mR-8R se diluyó hasta 20 µg/ml en medio sin suero y se incubó 1 ml/pocillo durante 1 hora (a) o 12 horas (b) con las células confluentes NIH3t3, MEF, CGR-8, HUES7 o IPS2 en placas de 6 pocillos. La preincubación de fluorescencia se asignó como el 100 % de las unidades y se restó el fondo del medio sin suero. Las barras de error indican d.e.

Figura 9 P21 se une directamente a Heparina. Fluorometría para determinar la proteína fluorescente que queda después de la incubación con esferas de heparina-sepharose. Las proteínas recombinantes se diluyeron (20 µg/ml) en medio sin suero y se incubaron 1 ml/tubo durante 1 hora a 37 °C con 50 µl de heparina-sepharose con rotación. La preincubación de fluorescencia se asignó como el 100 % de las unidades y se restó el fondo del medio sin suero. Las barras de error indican d.e.

Figura 10 Administración mediada por GET/HETD de las variantes de proteína de la posición del dominio. **(a)** Esquema de las proteínas creadas para probar el efecto de la posición del dominio en la administración de proteínas a las células. **(b)** La fusión de P21 y 8R a mR en cualquier orientación mejora significativamente la transducción. Análisis de citometría de flujo de las células NIH3t3 y HUES7 incubadas con las variantes de proteínas (20 µg/ml) durante doce horas. Las barras de error indican d.e.

Figura 11 Administración mediada por GET/HETD de variantes de proteína PTD. **(a)** Esquema de las proteínas creadas para probar el efecto de mejora de P21 en otros PTD para la administración de proteínas a las células. 8R es RRRRRRRR (SEQ ID NO: 19), TAT es proteína TAT del VIH-1 RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 20), 8K es KKKKKKKK, 8RQ es RQRQRQRQ. **(b)** La fusión de P21 y cualquier PTD a mR mejora significativamente la transducción. Análisis de citometría de flujo de las células NIH3t3 y HUES7 incubadas con las variantes de proteínas (20 µg/ml) durante doce horas. Las barras de error indican d.e.

Figura 12 La administración mediada por PTD se inhibe por heparina libre y sulfato de condroitina. La citometría de flujo analiza las células NIH3t3 tratadas con mR-8R (20 µg/ml) durante 6 horas con o sin una diversidad de GAG (50 µg/ml) en medio sin suero. CS es sulfato de condroitina. Las células se preincubaron durante 1 hora en medio sin suero y se transdujeron durante 6 horas en medio sin suero con o sin GAG. Las barras de error indican d.e.

Figura 13 La administración de proteínas GET/HETD se inhibe por FCS que contiene GAG, el tratamiento con heparinasa y la heparina soluble de competición. **(a-b)** Citometría de flujo de células transducidas pretratadas con heparinasa. **(a)** Las células NIH3t3 se preincubaron en medio sin suero durante 1 hora con diferentes cantidades de heparinasa III (0, 0,01, 0,1 o 1 U/ml) y se transdujeron con mR o P21-mR-8R (20 µg/ml en medio sin suero) que contenía heparinasa III durante 12 horas. **(b)** Las células NIH3t3 se preincubaron en medio sin suero durante 1 hora con diferentes cantidades de Heparinasa III y se transdujeron con P21-mR-8R (20 µg/ml) que contenía Heparinasa III y diferentes cantidades de FCS (0, 1 o 10 % (v/v)) durante 12 horas. **(c)** Citometría de flujo de células NIH3t3 transducidas en diferentes concentraciones de FCS o FCS que se ha agotado para el material de unión a P21. Las células NIH3t3 se preincubaron en medio sin suero durante 1 hora y se transdujeron con P21-mR-8R (20 µg/ml) que contenía diferentes cantidades de FCS (0, 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10 o 20 (v/v)) durante 6 horas. **(d)** Citometría de flujo de las células NIH3t3 transducidas en FCS al 10 % o FCS agotado en aglomerante P21 al 10 % con la adición de heparina soluble. Las células NIH3t3 se preincubaron en medio sin suero durante 1 hora y se transdujeron con P21-mR-8R (20 µg/ml) que contenía cualquier tipo de FCS y diferentes cantidades de heparina soluble (0, 0,1, 0,5, 1, 2, 5 o 50 µg/ml) durante 6 horas. Las barras de error indican d.e.

Figura 14 La administración mediada por GET/HETD se inhibe por el inhibidor de la síntesis de HS-GAG Clorato sódico. La citometría de flujo analiza las células NIH3t3 tratadas con P21-mR-8R (20 µg/ml) durante 6 horas con o sin clorato sódico (SC, 20 mM) en medio sin suero. Las células se preincubaron con o sin SC durante 1 hora en medio sin suero y se transdujeron durante 6 horas en medio sin suero con o sin SC. Las barras de error indican d.e.

Figura 15 GET/HETD pueden lograr niveles intracelulares superiores de administración de carga que los sistemas transgénicos. **(a)** Fluorometría de extractos solubles generados a partir de NIH3t3 mR (células NIH3t3 transgénicas transducidas con SIN mR) en comparación con las células NIH3t3 transducidas durante 6 horas con diferentes dosis de mR-8R o P21-mR-8R (0, 10, 20, 50, 100 o 200 µg/ml en medio sin suero). **(b)** Citometría de flujo de NIH3t3 mR (células NIH3t3 transgénicas transducidas con SIN mR) en comparación con las células NIH3t3 transducidas durante 6 horas con diferentes dosis de mR-8R o P21-mR-8R (0, 10, 20, 50, 100 o 200 µg/ml en medio sin suero). La fluorescencia se normaliza con respecto a las células NIH3t3 no tratadas. Las barras de error indican d.e.

Figura 16 Las proteínas marcadas con GET/HETD se agotan rápidamente del medio de cultivo por transfección eficiente. **(a-b)** Fluorometría de medios para determinar la proteína fluorescente restante que queda después de la incubación con células. Las proteínas recombinantes se diluyeron hasta 20 µg/ml en medio sin suero y se incubó 1 ml/pocillo durante 12 horas con NIH3t3s confluentes en placas de 6 pocillos. La preincubación de fluorescencia se asignó como el 100 % de las unidades y se restó el fondo del medio sin suero. **(a)** Agotamiento mediado por HUES7 de proteínas recombinantes de medio de cultivo en 12 horas. **(b)** Agotamiento mediado por NIH3t3 de proteínas recombinantes de medio de cultivo en 12 horas. **(c)** El agotamiento de T1/2 se calculó incubando las células NIH3t3 con proteínas recombinantes (20 µg/ml) en diferentes tiempos. El gráfico de barras muestra el tiempo (horas) requerido para agotar la proteína recombinante a la mitad de la concentración inicial en el sistema descrito. Las barras de error indican d.e.

Figura 17 La actividad nuclear de la Cre Recombinasa mediada por HERD es promovida por el escape de vesículas pero reprimida por los inhibidores de la macropinocitosis o el agotamiento del colesterol. Las células NIH3t3:LSL-eGFP se preincubaron en medio sin suero (con o sin fármacos), se transdujeron con proteínas Cre (mR-Cre: 100 µg/ml o P21-mR-8R: 10 µg/ml) durante 1 hora en medio sin suero (con o sin fármacos), se lavaron y se cultivaron durante 12 horas en medio de crecimiento completo (con o sin fármacos) y 36 horas más en medio de crecimiento completo antes de los análisis. **(a)** La metil-β-ciclodextrina (utilizada para reducir el colesterol) inhibe la transducción y recombinación de Cre. (Las dosis de metil-β-ciclodextrina fueron 0, 1 2 y 5 mM). **(b)** La nistatina (un fármaco que secuestra el colesterol) inhibe la transducción y recombinación de Cre. (Las dosis de nistatina fueron 0, 10, 20 y 50 µg/ml). **(c)** La amilorida (un inhibidor específico del intercambio de Na⁺/H⁺ requerido para la macropinocitosis) inhibe la transducción y recombinación de Cre. (Las dosis de amilorida fueron 0, 1, 5 o 10 mM). **(d)** La citocalasina D (un inhibidor de la elongación de la F-actina) inhibe la transducción y recombinación de Cre. (Las dosis de citocalasina D fueron 0, 1, 5 o 10 µM). **(e)** La cloroquina promueve la liberación de Cre de las vesículas endosómicas y aumenta la recombinación (Las dosis de cloroquina fueron 0, 10 y 100 µM). **(f)** Se requieren cantidades de picogramo por mililitros para inducir la recombinación con escape de vesículas mejorado. La dosis de P21-mR-Cre-8R transducida se varió en diluciones de diez veces (0-100 µg/ml) con 1 hora de incubación en presencia de cloroquina. Todos los datos se presentan como % de la recombinación máxima. Las barras de error indican d.e.

Figure 18 La transducción mediada por GET/HETD aumenta la macropinocitosis celular general. Citometría de flujo de células incubadas en 70 kDa de FITC-Dextrano y transducidas con proteínas recombinantes. Las células NIH3t3 se preincubaron en medio sin suero durante 1 hora y se transdujeron con mR, P21-mR, mR-8R o P21-mR-8R (20 µg/ml en medio sin suero) que contenía 70 kDa de FITC-Dextrano (neutro) durante 1 hora. Las barras de error indican d.e.

Figura 19 GET de cargas no proteicas. **(a)** GET de cargas biotiniladas que utilizan estreptavidina monomérica (mSA2). **(i)** Esquema de las proteínas mSA2 diseñadas para unirse y transducir cargas biotiniladas. P21-8R se usó como control sin interacción, mSA2 como control sin transducción, y P21-mSA2-8R como proteína de prueba. **(ii)** Esquema de los complejos de anticuerpos (Ab) de un anticuerpo primario biotinilado (1°) (cabra anti-conejo; GtaRb) unido a un anticuerpo secundario (2°) conjugado con FITC (conejo anti-ratón; Rb αMu) utilizado para probar la actividad. **(iii)** La administración GET de los complejos de Ab fue visible por microscopía de fluorescencia (barra de escala, 50 µm). Con la incubación conjunta de P21-mSA2-8R (10 µg/ml, imagen inferior), los complejos de Ab se administraron de manera eficiente a las células **(iv)** Citometría de flujo que demuestra que los complejos de Ab 172° (1 µg/ml) se toman en células NIH3t3 de forma deficiente por incubación directa o cuando se incuban conjuntamente con mSA2 solamente. **(b)** GET de ácidos nucleicos empleando el péptido LK15. **(i)** Esquema de las proteínas LK15 diseñadas para unirse y transducir ácidos nucleicos. **(ii)** Transfección de células madre mesenquimales humanas (iHMSC) utilizando GET-LK15. Inicialmente, se evaluó la capacidad de unión de los péptidos LK15 para el plásmido (p)DNA (SIN GFP, para expresar GFP en la transfección), ARN mensajero sintético modificado (modRNA) (Miltenty Biotech; para expresar GFP en la transfección) y ARN(si) de inhibidores pequeños (etiquetados con fluoróforo FAM para detectar la administración). Después de optimizar las relaciones, se transfectaron iHMSC con P21-LK15-8R y pDNA (10 µg), modRNA (10 µg) o ARNsi (1 µg) y se

visualizó la transfección por microscopía de fluorescencia (barra de escala, 100 μ m). (iii) Cuantificación de la transfección con GET-LK15 de iHMSC por citometría de flujo (% de eficiencia de transfección o fluorescencia relativa para ARNsi) en comparación con lipofectamine (LIPO) 2000 como estándar comercial. Las barras de error indican d.e. (c) GET de nanopartículas magnéticas. (i) Esquema del péptido P21-8R sintetizado y nanopartículas magnéticas de prueba (MNP). Se probaron MNP con cubierta de Nanomag-D dextrano a 250 nm/núcleo de óxido de hierro y el péptido P21-8R conjugado con los grupos COOH de superficie. (ii) Las MNP se toman en las células NIH3t3 de manera más eficiente en medio sin suero (SFM; panel izquierdo). Imágenes de microscopía óptica de células NIH3t3 teñidas con hierro de azul de Prusia tratadas con MNP (50 μ g/ml) durante doce horas en condiciones de medios estándar (10% FCS) o SFM. La conjugación de P21-8R con MNP aumenta significativamente la captación celular en condiciones tanto de FCS al 10 % como de SFM (la imagen circular es de todo el pocillo, barra de escala, 100 μ m).

Figura 20 Auto-etiquetado de ligando de las proteínas HALO ancladas a la membrana intracelular y extracelular. (a) Esquema de las construcciones de lentivirus transgénicas de HALO (intracelular) y LAMP2b-HALO (anclado a la membrana extracelular). En LAMP2b-HALO, la proteína expresada se localiza en la membrana celular mediante el péptido señal (SIG) que se escinde y se presenta en el lado extracelular de la membrana celular (b) Las células transgénicas NIH3t3 para la proteína HALO intracelular (NIH3t3-HALO) se etiquetan solo eficientemente por los ligandos de permeabilidad celular (HALO^{tag} Oregon Green). Las células NIH3t3 transgénicas para la proteína HALO extracelular anclada a la membrana (NIH3t3-LAMP2b) se marcan de manera eficiente con ligandos permeables e impermeables a las células (HALO^{tag} Alexafluor⁴⁸⁸). Los datos muestran la citometría de flujo de las líneas celulares NIH3t3 incubadas en ligando (1 μ M) durante 15 min, seguido de 3 lavados con medio y una incubación de 15 min para eliminar el ligando no unido. Las barras de error indican d.e. Esto proporciona un ensayo para evaluar la localización intraverso extracelular de las proteínas HALO.

Figura 21 El etiquetado de ligandos de las proteínas GET-HALO demuestra una rápida unión celular y transducción. (a) Esquema de las proteínas HALO creadas (como se describe para mRFP en la Figura 1). (b) P21-HALO-8R y P21-HALO se unen eficazmente a las células NIH3t3 pero no se internalizan significativamente con una incubación de 1 hora. (c) P21-HALO-8R unido se transduce eficientemente en células NIH3t3 con incubación adicional (1 h-5 h). P21-HALO unido no entra tan eficientemente en las células y permanece unido a la membrana celular con una incubación adicional. Los datos muestran los análisis de citometría de flujo de células NIH3t3 tratadas con proteínas (20 μ g/ml) durante 1 hora, seguido del etiquetado de ligandos directo (1 h) o incubación adicional de 5 horas (1 h-5 h). Las barras de error indican d.e.

Figura 22 La sensibilidad al pH de las proteínas GET-mNectarine (mNect) demuestra una rápida unión y transducción celular. (a) Esquema de las proteínas HALO creadas (como se describe para mRFP en la Figura 1). (b-c) Las proteínas GET-mNect o GET-mR (20 μ g/ml) se transdujeron en las células NIH3t3 durante 1 h (para demostrar la actividad de unión a la membrana), 1 h seguido de 5 horas más de incubación sin proteína (1 h-5 h) (para demostrar la actividad de transducción) o 6 h (para demostrar una administración sostenida). Se utilizó la citometría de flujo para comparar las intensidades de las proteínas mNect y mR GET. La señal de fluorescencia procedente de la transducción de proteínas mNect (a diferencia de las versiones mR) se pierde rápidamente después de la internalización nueva para la acidificación endosómica y el despliegue de proteínas. Las barras de error indican d.e. (d-f) Las proteínas GET-mNect (20 μ g/ml) se transdujeron en células NIH3t3 para los mismos regímenes, pero se lavaron en DMEM a pH 7,5 o pH 5,5 antes de la citometría. La fluorescencia de la proteína mNect localizada en la membrana se extingue con un pH de 5,5, pero se mantiene a un pH de 7,5, lo que indica que en 1 h las incubaciones dejan el P21-mNect-8R externo a las células, unido a las membranas y no protegido del despliegue mediado por el pH. Las incubaciones de 1 h-5 h demuestran que la localización de P21-mNect-8R se desplaza y se protege de un despliegue mediado por pH, lo que demuestra la internalización de la proteína y la protección por la membrana celular. Las barras de error indican d.e.

Figura 23 La proteína GET debe administrarse intracelularmente para permitir una retransducción exitosa (a) Esquema de prueba del efecto de la retransducción de proteínas GET en células NIH3t3. Las células se preincubaron en medio fresco durante 1 hora y se transdujeron con P21-mR-8R (20 μ g/ml) durante 1 hora. Después, las células se analizaron para determinar la fluorescencia o se volvieron a transducir con P21-mR-8R (20 μ g/ml) durante 1 hora más. Esta retransducción fue inmediata (0 h) o con una incubación de 1 a 6 horas entre la re-transducción antes de los análisis de fluorescencia por citometría de flujo. La retransducción inmediata se inhibe, mientras que >1 hora de incubación entre transducciones permite la retransducción más eficiente de la proteína GET. Las barras de error indican d.e. * p<0,05.

Figura 24 GET en comparación con la transducción de solo CPP de NEO. (a) Esquema de mR-NEO-8R (proteína solo CPP) y P21-mR-NEO-8R (proteína GET). (b) P21-mR-NEO-8R mantiene los cultivos vivos de MEF bajo la selección de G-418 mientras que mR-NEO-8R tiene una mala actividad de rescate. La actividad de P21-mR-NEO-8R es comparable a las células genéticamente complementadas con SIN NEO (para sobreexpresar NEO). Los datos muestran los números de células MEF para la dosis de 150 μ g/ml de G-418. Las barras de error indican d.e.

Figura 25 GET en comparación con la transducción de solo CPP de NANOG. **(a)** Esquema de mR-NANOG-8R (proteína solo CPP) y P21-mR-NANOG-8R (proteína GET). **(b)** P21-mR-NANOG-8R mantiene la proliferación de mESC sin dosis de LIF de forma dependiente, mientras que mR-NANOG-8R tiene una mala actividad de renovación. Los datos muestran el porcentaje del número de células CGR-8 cultivadas sin LIF frente a las cultivadas con LIF (% de -LIF/+LIF) en el pase. En cultivos de CGR-8 deficientes en LIF la proliferación se promueve cuando se complementa con SIN NANOG (para sobreexpresar NANOG) o se transduce con P21-mR-NANOG-8R pero muy mal por mR-NANOG-8R. Las barras de error indican d.e.

Figura 26 GET en comparación con la transducción de solo CPP de MYOD. **(a)** Esquema de mR-MYOD-8R (proteína solo CPP) y P21-mR-MYOD-8R (proteína GET). **(b)** P21-mR-MYOD-8R impulsa la diferenciación miogénica de células HUES7 con respecto a miotubos multinucleados positivos a MIOGENINA, mientras que mR-MYOD-8R tiene una mala actividad miogénica. La actividad de P21-mR-MYOD-8R es comparable con las células complementadas genéticamente con SIN MYOD (para sobreexpresar MYOD). Los datos muestran la cuantificación del porcentaje de células positivas a MIOGENINA utilizando inmunoetiquetado. Las barras de error indican d.e.

Figura 27 Administración de una proteína proapoptótica extraída de tejido por GET-mSA2. **(a)** Esquema de complejos de citocromo de corazón bovino-C (Cyt-C) u Cyt-C biotinilado (BIO-Cyt-C) y Cyt-C con mSA2. **(b)** Coincubación de Cyt-C (como control sin interacción) o BIO-Cyt-C (10 µg/ml) con proteínas GET-mSA2 en presencia de cloroquina (100 µM) para inducir la apoptosis de NIH3t3. Según se evaluó por la exclusión de azul de tripano después de una incubación de 12 horas, solo el complejo de interacción total y transducción (con cloroquina) medió la pérdida de la viabilidad celular. Las barras de error indican d.e. **(c)** BIO-Cyt-C transducido con P21-mSA2-8R en presencia de cloroquina causó una pérdida completa de la viabilidad celular demostrada por microscopía óptica. (barra de escala, 50 µm).

Figura 28 GET de anticuerpos usando el dominio SpA B. **(a)** Esquema de las proteínas SpAB y P21-SpAB-8R diseñadas para unirse a y transducir anticuerpos IgG. Se ensayó la administración de una IgG anti-ratón de conejo conjugada con FITC (Rb IgG-FITC). **(b)** Se tomó IgG (1 µg/ml) en células NIH3t3 deficientes por incubación directa o cuando se incubaron conjuntamente con SpAB (panel izquierdo). Con la incubación conjunta de P21-SpAB-8R (10 µg/ml, panel derecho), la IgG se administró eficientemente a las células visibles mediante microscopía de fluorescencia (barra de escala, 50 µm). **(c)** La citometría de flujo de las células administradas confirmó un aumento en la administración de IgG de más de 2 órdenes de magnitud. Las barras de error indican d.e.

Figura 29 La adición de P21 y CPP a las cargas mejora la administración en >dos órdenes de magnitud. Las líneas celulares (descritas en la Figura 1) que incluyen células de músculo liso aórtico de rata (rSMC) y cardiomiocitos neonatales (rCMs) se transdujeron con variantes fusionadas a mRFP de proteínas de carga (mR, mR-Cre, mR-NEO, mR-NANOG o mR -MYOD) o con cargas con secuencias P21 fusionadas en el extremo N y 8R (CPP) fusionadas en el extremo C (proteínas GET; P21-mR-8R, P21-mR-Cre-8R, P21-mR-NEO-8R, P21-mR-NANOG-8R o P21-mR-MYOD-8R). Las transducciones se realizaron a 20 µg/ml de proteína durante 24 horas en el medio estándar de la línea celular. Los datos muestran el aumento en veces de la transducción con la adición de secuencias GET (P21 y 8R) a las cargas según lo evaluado por citometría de flujo. Las barras de error indican d.e.

Figura 30 La transducción GET de alto nivel o constante no afecta la viabilidad celular **(a)** Evaluación de la viabilidad celular mediante exclusión de azul de tripano de NIH3t3s transducidas durante 12 horas con 0-200 µg/ml de proteína P21-mR-8R ya sea directamente después de la transducción (0 h; izquierda) o 24 horas después de la transducción (24 h; derecha). **(b)** Evaluación de la proliferación celular después de la transducción mediante pases y recuentos celulares de NIH3t3s transducidas durante 24 horas con 0-200 µg/ml de proteína P21-mR-8R. **(c)** Evaluación de la proliferación celular durante la transducción constante por pases y recuentos de células de NIH3t3s transducidas con 0-200 µg/ml de proteína P21-mR-8R (proteína actualizada en cada pase). Las células se pasaron diariamente y se volvieron a colocar en placas con 100.000 células por cada 12 pocillos. Las barras de error indican d.e.

Figura 31 GET es biocompatible en múltiples tipos de células clínicamente relevantes. Las líneas celulares se transdujeron con P21-mR-8R a 20 o 200 µg/ml durante 24 horas y se evaluaron con azul de tripano para determinar la viabilidad celular (las líneas celulares fueron las descritas en la Figura 1, incluidas las células del músculo liso aórtico de rata (rSMC) y los cardiomiocitos neonatales (rCM)). La viabilidad se mantuvo alta en todos los tipos de células para ambas concentraciones probadas. Las barras de error indican d.e.

Figura 32 A: Diagrama esquemático de una nanopartícula recubierta con dextrano, B: Tinción con azul de Prusia de 50 µg de nanopartículas Nanomag-D marcadas con P21mR y partículas y proteína añadidas por separado, C: Fluorescencia de partículas Nanomag-D marcadas con proteína roja fluorescente, D: Fluorescencia de soluciones pre y post-etiquetado.

Figura 33 A: Tinción con azul de Prusia de partículas nanomag incubadas con células 3t3 durante 24 horas, B: Resultados del ensayo de hierro para la cantidad de hierro por célula después de la incubación de 24 horas.

Figura 34 A: Tinción con azul de Prusia de partículas nanomag-D incubadas en células 3t3 durante tiempos variables, B: Los resultados de la cuantificación del ensayo de hierro.

Figura 35 A: Células 3t3 incubadas con 50 µg de nanopartículas, 1 µM de P218R y diversas cantidades de heparina analizadas por ensayo de hierro. B: Incubadas con dextrano. C: Incubadas con cantidades variables de suero. D Fluorescencia de células 3t3 después de la incubación con Fitc-BSA.

Figura 36 Administración mejorada mediada por GET de mRFP a las células a través del péptido P21 mRFP 8R. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células NIH3T3 tratadas con péptidos FmRFP, P21 mRFP, mRFP 8R y P21 mRFP 8R (20 µg/ml) durante doce horas. Las imágenes también incluyen células que no fueron tratadas con ningún péptido, como control. Barra de escala, 100 µm.

Figura 37 Gráfico que muestra células NIH3T3, CGR-8 y HUES7 tratadas con péptidos conjugados con mRFP (20 µg/ml) durante 12 h. Se utilizó el análisis de citometría de flujo para cuantificar la fluorescencia (unidades relativas de fluorescencia (URF)) de las células. Las barras de error indican d.e., n = 3.

Figura 38 Gráfico que muestra el aumento en la transducción de mRFP en células por CPP modificados (dominio de unión a HS-GAG mRFP 8R) sobre un CPP no modificado (mRFP 8R). Las células NIH3T3, CGR-8 y HUES7 se trataron con péptidos conjugados con mRFP (20 µg/ml) durante 12 h. Las barras de error indican d.e., n = 3.

Figura 39 Administración eficiente de mRFP a las células a través de péptidos modificados que promueven la GET. Imágenes de microscopía de fluorescencia de las células NIH3T3, CGR8 y HUES-7 tratadas con los péptidos P21 mRFP 8R, FGF2B mRFP 8R, FGF7B mRFP 8R y PDGF mRFP 8R (20 µg/ml) durante doce horas. Barra de escala, 100 µm.

Figura 40 Optimización de la relación de carga (+/-) de P21 LK15 8R con respecto a pSIN GFP usando el ensayo de YO-PRO-1. El gráfico muestra una disminución en el % de fluorescencia a medida que P21 LK15 8R se une a pSIN GFP. Las barras de error indican d.e., n = 3.

Figura 41 Ejemplos de gráficos de puntos de citometría de flujo que muestran la expresión de GFP de células NIH3T3 después de la transfección con pSIN GFP durante 6 h. Después de la transfección, las células se fijaron en un punto de tiempo de 48 h. Se usó un análisis de citometría de flujo para cuantificar el % de células positivas a GFP.

Figura 42 Optimización de la transfección de pSIN GFP en células NIH3T3 por el péptido P21 LK15 8R. Las células se trataron con la relación de carga óptima (+/-) de P21 LK15 8R con respecto a pSIN GFP de 2:1, respectivamente. La optimización se realizó en tiempos de transfección variables (3, 6 y 24 h) en (A) medio de transfección de suero al 10 % (B) medio de transfección sin suero. Después de la transfección, las células se fijaron en un punto de tiempo de 48 h. Se usó un análisis de citometría de flujo para cuantificar el % de células positivas a GFP. Las barras de error indican d.e., n = 3.

Figura 43 Gráfico que muestra la optimización de la transfección de pSIN GFP en las células NIH3T3 por Lipofectamine2000, en condiciones sin suero. Se usó un análisis de citometría de flujo para cuantificar el % de células positivas a GFP. Las barras de error indican d.e., n = 3.

Introducción

Las células madre pluripotentes humanas (HPSC) comprenden HESC derivadas de la masa celular interna del embrión preimplantado, y las HiPSC generadas por la reprogramación epigenética de células somáticas {Robinton, 2012 N.º 30}. La capacidad de controlar el comportamiento y la diferenciación de estas células de manera eficiente y reproducible respalda los esfuerzos actuales en medicina regenerativa y personalizada. Un método transgénico impulsado por el factor de transcripción ha sido descrito previamente para programar directamente las redes reguladoras de genes en HPSC para impulsar la diferenciación cardíaca y crear cardiomiocitos contráctiles {Dixon, N.º 11}. Se han descrito muchos métodos impulsados por transgenes para controlar los comportamientos celulares, como la reprogramación genómica {Takahashi, 2007 N.º 82}, la auto-renovación {Chambers, 2003 N.º 70}, la diferenciación {Dixon, N.º 11}, la apoptosis {Mohan, 2013 N.º 83}, proliferación {Zhao, 2013 N.º 85} o la migración {Deboux, 2013 N.º 84}. Todos estos implican la integración del ADN para permitir la expresión génica exógena, usualmente utilizando vectores virales o transfección de ADN transitoria que es ineficiente y también puede conducir a la modificación genómica. Los enfoques tales como la transfección del ARN {Warren, 2010 N.º 4} o la administración de proteínas mediada por PTD {Zhou, 2009 N.º 72} son, por lo tanto, una alternativa atractiva con estequiometría controlada y no tienen posibilidad de integración genómica {Gump, 2007 N.º 39}. Fue un objetivo desarrollar la tecnología de PTD para permitir la administración robusta de proteínas bioactivas en células madre

pluripotentes que podrían reemplazar las tecnologías actuales y utilizarse para mejorar la adopción de HPSC para aplicaciones de medicina regenerativa.

Resultados

Aislamiento de P21, un HBD que mejora la función de PTD a través de la interacción de HS-GAG

Un enfoque fue mejorar la interacción inicial del PTD y la transducción de la bicapa lipídica de las proteínas de carga en lugar de en el escape endosómico. Inicialmente, la proteína fluorescente roja monomérica (mRFP1) se empleó como carga autoinformable que se expresa y se purifica fácilmente en *Escherichia coli* (Figura 1a). La investigación condujo a la determinación de que los PTD TAT y 8R interactúan con las membranas celulares de las mESC, HESC y HiPSC (Figura 8a) pero tienen una transducción muy pobre de la carga (□1-3 veces sobre el control) (Figura 1 y 8b). Esto fue en comparación con las líneas celulares ampliamente probadas (tales como NIH3t3, C2C12 y fibroblastos embrionarios de ratón) que mostraron una administración eficiente (□5-50 veces sobre el control, $p<0,01$) (Figura 1). Informes anteriores han demostrado la administración funcional de proteínas etiquetadas con PTD en células madre pluripotentes con diferentes grados de robustez {Do Kwon, 2005 N.º 74; Liang, 2013 N.º 73}. Se planteó la hipótesis de que el éxito alcanzado en estos estudios se debió a cantidades mínimas de proteínas eficaces requeridas, la administración de proteínas en los derivados diferenciados en lugar de la población inicial, o el uso de grandes cantidades de proteínas para obtener una funcionalidad de bajo nivel.

Esto tenía el objetivo de mejorar la unión y, finalmente, la transducción de proteínas de carga en estos tipos de células diana. Se seleccionaron varios péptidos cortos que se ha informado que interactúan con las moléculas que se sabe que están presentes en las membranas de mESC, HESC o HiPSC, incluyendo integrinas, los marcadores de CD y los GAG. Los péptidos se fusionaron N-terminalmente a mRFP1, se expresaron, se purificaron por afinidad y se incubaron con los tres tipos de células. La selección de 12 variantes produjo una que aumentó claramente la localización de fluorescencia con mRFP1 (mR) en las células y sus membranas, denominada P21 (KRKKKGKGLGKKRDPCLRKYK (SEQ ID NO: 1)) (Figura 2). De forma interesante, este péptido también demostró actividad de transducción como lo demuestra la fluorescencia intracelular punteada indicativa de la localización endosomal (Figura 2b,c). P21 se derivó de HB-EGF, que pertenece a la familia de citocinas del EGF. HB-EGF muestra una fuerte afinidad por la heparina y se une al mismo receptor que EGF y TGF- α {Sakuma, 1997 N.º 76}. La interacción de HB-EGF con HS-GAG de la superficie celular es esencial para su unión óptima a EGFR y para promover su crecimiento/actividad migratoria hacia las células del músculo liso vascular {Higashiyama, 1993 N.º 90}. La mutagénesis y la digestión con proteasa de HB-EGF recombinante, junto con los análisis que utilizan péptidos sintéticos y heparina, revelaron que la secuencia P21 en la región amino-terminal del HB-EGF soluble es responsable de su unión a la heparina, por lo que se considera un HBD típico {Thompson, 1994 N.º 77}. Además, P21 también interactúa con HS-GAG de la superficie celular pero no con el EGFR que está mediado por otras secuencias en HB-EGF. Por lo tanto, se aisló un péptido corto de 21 residuos, P21, que mejora la asociación de un indicador fluorescente a células madre pluripotentes tanto de ratón como humanas.

Para confirmar la unión directa de P21 a heparina, se desarrolló un ensayo de unión utilizando perlas de heparina-sepharose (Figura 9). La mR marcada con P21 se secuestró de manera eficiente por la heparina-sepharose a diferencia de la mR sin etiquetar ($96,2 \pm 5,3\%$; $p<0,01$). Esto podría invertirse mediante la incubación conjunta con heparina libre de una manera dependiente de la dosis. El hecho de que un HBD se aisló es interesante; los HS-GAG han sido considerados importantes en el proceso de transducción mediada por PTD. Sin embargo, el papel exacto de HS-GAG en la transducción es actualmente un punto de discusión con la hipótesis más reciente de que HS-GAG es meramente importante en la transducción al unirse directamente a los PTD y concentrarlos en la membrana; esto mejora la translocación de la bicapa lipídica, pero no es necesario para su aparición {Gump, 2010 N.º 2}.

Los proteoglicanos sulfatados con carga negativa y las glucoproteínas están presentes en todas las células de mamífero. Sin embargo, se modifican de manera diferente y las variantes específicas son ubicuas o están presentes en tipos celulares muy específicos {Findahl, 1998 N.º 56}. Los proteoglicanos anclados a GPI y las glucoproteínas están presentes en las balsas lipídicas, lo que sugiere que los PTD pueden tener mayor avidez por ciertos proteoglicanos o quizás los PTD se unen directamente a los constituyentes de la membrana del colesterol que desencadenan la macropinocitosis. También es posible que el péptido P21 pueda tener una avidez específica a ciertas formas de HS-GAG y pueda reconocer los mismos motivos en los PTD.

La unión mediada por P21 de las membranas celulares se ensayó para determinar si podría mejorar la transducción de mR mediada por PTD combinando ambos restos en una molécula (Figura 2a). P21-mR-8R se clonó, se expresó y se purificó, y su actividad se comparó con las proteínas solo P21 (denominadas P21-mR) o solo 8R (mR-8R) (Figura 2a). Los datos demostraron que la inclusión de los restos tanto P21 como 8R experimenta sinergia en la misma proteína para mejorar significativamente la fluorescencia de todas las líneas celulares ensayadas. (Figura 2b). Es importante destacar que las células madre pluripotentes de ratón y humanas (CGR-8, HUES7 e IPS2) y los cardiomiocitos (HL1) solo se transdujeron de manera eficiente con la inclusión de la etiqueta P21, y ambas etiquetas experimentaron sinergia para producir niveles altos de transducción similares a los observados en otras líneas celulares (Figura 2c). Estos motivos también se colocaron en tándem en los extremos N- y C-terminal de mRFP (P21 u 8R primero; P21-8R-mR, 8R-P21-mR o mR-P21-8R, mR-8R-P21) o cambiaron sus extremos (es decir, 8R-mR-

P21) demostrando todas las variantes un comportamiento de sinergia y transducción celular similares (Figura 10) como se ve para P21-mR-8R. Además, se cambió el 8R por PTD alternativos bien caracterizados (TAT, 8K y 8RQ; {El-Andaloussi, 2005 N.º 36}) y mostró que estos también experimentaron sinergia con P21 (Figura 11).

- 5 Al incubar células con proteína para diferentes tiempos e incluir un periodo de post-cultivo, se podría distinguir de manera eficiente entre la señal de fluorescencia producida en la superficie celular con la internalizada (Figura 2d). Las células demostraron la localización de la fluorescencia en la membrana con tiempos de incubación cortos (1 hora), denominados 1 h. Con esta corta incubación y un periodo de cultivo posterior (1 hora con un post-cultivo de 5 horas), denominado 1 h-5 h, se observa una transducción indicadora de fluorescencia intracelular casi exclusiva.
- 10 Usando tiempos de incubación más largos (6 horas), denominados 6 h, las células presentaron una fuerte fluorescencia perinuclear puntiforme indicativa de transducción mediada por endosoma. Este mecanismo de administración sinérgica se describe como transducción mejorada de unión a GAG (GET) o, de otro modo, administración mediada por el dominio de transducción potenciada con sulfato de heparán (HETD).

15 **GET requiere la presencia de moléculas de membrana celular sensibles a tripsina y solubles en detergente**

- Para evaluar el mecanismo de interacción GET y la captación por las células, se realizó una serie de experimentos que se utilizaron previamente para evaluar el PTD. Para evaluar qué componentes de la membrana celular se requieren tanto para la asociación celular inicial como para la transducción por HETD, se determinó si se obtendría una transducción similar mediante el agotamiento enzimático de la membrana celular antes de la transducción. Las células se trataron previamente con la enzima proteolítica tripsina y se ensayó la transducción celular utilizando el protocolo del régimen de 1 h-5 h. La eliminación enzimática de proteínas de la superficie celular inhibió
- 20 potentemente la transducción mediada por GET/HETD (~8,4 veces; $p < 0,05$) (Figura 2e). Por el contrario, la liberación no enzimática de las células del plástico de cultivo utilizando una solución de disociación de células iónicas (CDS) no alteró la captación mediada por HETD.
- 25

- A continuación, se probó si el agotamiento de las moléculas de membrana celular solubles en detergentes también tendría un efecto similar en la transducción. Las células se preincubaron en Triton X-100 al 0,1 % (v/v) y, utilizando el protocolo de 1 h-5 h, se observó una disminución ($\square 2,2$ veces; $p < 0,05$) en GET (Figura 2f) sin una disminución de la viabilidad. Por lo tanto, se demostró que los restos solubles tanto en proteínas como en detergentes en la membrana celular afectan a la eficacia de la transducción de proteínas a través de la sinergia con P21 y PTD en la transducción GET/por HETD.
- 30

35 **GET requiere la presencia de HS-GAG de la membrana celular**

- P21 es un HBD, y los PTD debido a su naturaleza catiónica se unen a HS-GAG cargados negativamente. También tuvo como objetivo confirmar el mecanismo de la transducción mediada por GET/HETD mediante el agotamiento enzimático de HS-GAG o la competición con GAG libres (Figura 3). La heparina evitó la unión de la superficie celular de las proteínas HETD e inhibió fuertemente la transducción ($99,8 \pm 2,1$ %; $p < 0,001$) (Figura 3a, b). El sulfato de condroitina (CS) A, B o C tuvo poco efecto en cualquiera de las actividades (Figura 3b). Se ha demostrado anteriormente que CS-B y -C afectan a la unión de proteínas del PTD {Wadia, 2004 N.º 25}. Se confirmó que la heparina, CS-B y -C tienen actividades significativas la inhibición de la transducción de proteínas solo PTD (8,1, 2,4 y 4,1 veces, respectivamente; $p < 0,05$), pero que solo la heparina afectó a la GET/transducción mediada por HETD (Figura 3b y Figura 12). Las proteínas marcadas con P21 presentan una inhibición dependiente de la dosis de la transducción con concentraciones crecientes de heparina en las células NIH3t3 y CGR-8 (Figura 3c y d, respectivamente). La proteína solo 8R se inhibe solo con las dosis más altas de heparina competente. En el contexto de la proteína HETD (P21-mR-8R), por lo tanto, es probable que la afección de P21 para los HS-GAG de membrana celular sea mucho mayor que la de los CS-GAG para la unión a PTD. Por lo tanto, se puede concluir que la heparina y los HS-GAG son el objetivo principal del P21 para mejorar la actividad del PTD.
- 40
- 45
- 50

- Para comprender mejor el requisito de HS-GAG de membrana celular por la actividad de P21, las células se trataron con enzima HS-liasa, heparinasa III y se ensayó la transducción celular utilizando el protocolo de 6 h (Figura 13). La eliminación enzimática de los HS-GAG de la superficie celular inhibió potentemente la transducción mediada por GET/HETD (a 1 U/ml $97,2 \pm 3,4$ %; $p < 0,001$). Por el contrario, el tratamiento con neuraminidasa que agota los GAG de ácido siálico (SA-GAG) no alteró la captación mediada por GET/HETD. El análisis se amplió adicionalmente para definir el efecto del suero en la transducción (Figura 13b). Se ha demostrado previamente que el suero tiene un efecto negativo en la administración mediada por PTD {Kaplan, 2005 N.º 43}. Al incubar el suero con péptido P21 purificado por afinidad sobre sepharose, se pudo eliminar su efecto inhibitorio sobre la recombinación mediada por HETD (10 % v/v, aumento de ~7,3 veces con el agotamiento; $p < 0,01$) (Figura 13c). Esto indica que es probable que el suero contenga GAG que actúen como moléculas competitivas para la unión a la membrana P21. Estos pueden eliminarse mediante agotamiento previo utilizando sepharose unida a P21. Esta actividad inhibitoria podría reconstituirse mediante la adición de heparina soluble al suero agotado, reforzando aún más esta hipótesis (Figura 13d). Además del agotamiento enzimático, el requisito de HS-GAG se confirmó tratando las células con clorato de sodio, un potente inhibidor de la síntesis de HS que también impidió potentemente la administración de proteínas mediada por HETD ($\square 7,6$ veces; $p < 0,05$) (Figura 14). Por lo tanto, se demostró que el agotamiento de HS-GAG afecta específicamente a la eficacia de la transducción de proteínas y, por lo tanto, los HS-GAG endógenos son
- 55
- 60
- 65

moléculas importantes para la administración de proteínas mediada por GET/HETD. También que los HS-GAG exógenos son altamente inhibidores para este proceso.

Los HS-GAG tienen una estructura de azúcar compleja, que consiste en un esqueleto de disacáridos repetidos de ácido glucurónico (GlcUA) y N-acetilglucosamina (GlcNAc), polimerizados por un complejo heteromérico de enzimas EXT1/EXT2 {Lawrence, 2008 N.º 51}. Para investigar más a fondo el papel de los HS-GAG en la transducción mediada por GET/HETD, se utilizaron *EXT1*^{-/-} mESC, que carecen de la membrana celular HS-GAG sintetizada de manera endógena {Lin, 2000 N.º 78}. Al cultivarse en medio de mESC convencional (que contenía FCS al 20 % p/v), se observó una transducción significativamente menor en mESC *EXT1*^{-/-} mESC frente a CGR-8 de tipo silvestre (□6,8 veces; $p < 0,01$) (Figura 3e,f). Esto también fue evidente cuando las células se cultivaron en condiciones sin suero probablemente debido a la interferencia de GAG libres en FCS (~5,6 veces; $p < 0,01$). La transducción/GET no estuvo ausente en las células *EXT1*^{-/-} (□9,7 veces sobre los niveles de control de mR) ni fue la unión inicial de las proteínas que contienen P21. Se planteó la hipótesis de que esto podría deberse a la incorporación de suero-GAG solubles exógenos en la membrana celular deficiente en *EXT1*^{-/-}. Es probable que, como consecuencia, el tratamiento con heparinasa III inhiba adicionalmente la unión y la transducción en estas células.

GET genera niveles de proteína intracelular superiores que la transgénesis Lentiviral

Varios estudios han concluido que la transducción mediada por PTD es lo suficientemente refinada para permitir el transporte de cargas biológicamente activas para estudios clínicos. Estos incluyen ahora ensayos de terapias contra el cáncer {Gump, 2007 N.º 39}, ARNsi {Meade, 2007 N.º 37} y tecnologías de imagen *in vivo* {Bullok, 2006 N.º 79}. Además de los beneficios de evitar la modificación genómica, si la transducción mediada por PTD debe ser preferencial a los enfoques de terapia génica, debe lograr la administración de niveles altos de molécula, ser susceptible de controlar los niveles de proteína en plazos cortos y también permitir la administración específica del tipo celular. Los niveles alcanzados en las células mediante la administración de PTD o GET/HETD se compararon con los logrados mediante una transducción lentiviral eficiente {Dick, 2011 N.º 10} y la expresión exógena de mRFP1 (con un promotor EF1 α estable impulsado) (Figura 15). Para lograr esto, la proteína soluble se extrajo de las células transducidas y se midieron las cantidades por fluorometría (Figura 15a), o se usó citometría de flujo (Figura 15b). Utilizando incubaciones de 6 horas, los niveles de mR-8R fueron varias veces más bajos (~3 veces; $p < 0,05$) que los alcanzados por la transgénesis viral incluso en las dosis más altas probadas (200 $\mu\text{g/ml}$). Sin embargo, los niveles de P21-mR-8R en las mismas condiciones fueron ~16 veces más altos ($p < 0,001$) que las células transgénicas. Es importante destacar que de la cantidad de proteína P21-mR-8R incubada se recuperó una proporción significativa como proteína intracelular soluble (□46 $\pm$ 3,5 $\mu\text{g}/200 \mu\text{g}$ utilizados; ~23 $\pm$ 1,7 % de recuperación). Es importante tener en cuenta que, en estas condiciones, las células transducidas parecen de color rojo/púrpura bajo la luz normal, lo que demuestra el enriquecimiento eficiente de grandes cantidades de proteínas etiquetadas con HETD/GET en las células.

La velocidad a la que estas proteínas se concentraron en las células se investigó midiendo el agotamiento de la fluorescencia en el medio durante el periodo de incubación (Figura 16). Las proteínas se diluyeron (20 $\mu\text{g/ml}$) y se incubaron con células durante 12 horas en condiciones sin suero. Las proteínas marcadas con 8R se agotaron en ~12 % en incubaciones con NIH3t3 y ~3,5 % en incubaciones con HUES7. Esto refleja con precisión los datos de citometría de flujo con proteínas 8R poco transducidas en células HUES7 pero a niveles moderados en células NIH3t3 (Figura 2). Las proteínas marcadas con P21 se agotaron significativamente en ambos tipos de células (~37 % y ~25 % en células NIH3t3 y HUES7, respectivamente; $p < 0,05$) con proteínas HETD agotadas del medio a los niveles más altos y la mayoría de las proteínas eliminadas (□72 y □66 % en células NIH3t3 y HUES7, respectivamente; $p < 0,01$).

Se determinó el tiempo requerido para agotar la mitad de la fluorescencia ($T_{1/2}$), requiriendo P21-mR-8R solo □9,4 horas, en comparación con mR-8R que requirió □62 horas y la proteína no marcada nunca alcanzó la mitad de agotamiento incluso después de 7 días (Figura 16). Estos datos son corroborativos con los datos citométricos que demuestran un enriquecimiento rápido y eficiente de la proteína GET exógena/proteína HETD en las células. Por lo tanto, se demostró que dentro de un periodo de incubación relativamente corto (6 horas) se puede lograr una concentración de proteínas significativa dentro de las células. En menos de un día, la mayoría de las proteínas extracelulares se han internalizado de manera eficaz utilizando la administración GET. Este sistema será susceptible de una regulación precisa de la estequiometría de proteínas, evitando al mismo tiempo la variación de la expresión del transgén estocástico y el silenciamiento de los vectores de integración utilizados en los enfoques de terapia génica.

GET mejora la modificación genómica mediada por Cre

Se determinó que los HETD se unen rápidamente a las membranas celulares a través de los HS-GAG y se transducen de manera eficiente en las células, pero aún no se había confirmado si el modo de captación era a través de macropinocitosis como en los PTD. Además, no se evaluó qué proporción de esta proteína escapó de los endosomas y puede considerarse que se administró con éxito. Los estudios anteriores han evitado los problemas asociados con la medición directa de proteínas marcadas con fluorescencia (tal como la incapacidad para distinguir la membrana, la vesícula o la proteína citosólica/nuclear funcional) al evaluar la actividad nuclear exitosa de la

recombinasa Cre {Gump, 2010 N.º 2}. Este sistema se usó para medir la recombinación mediada por Cre de un gen indicador de proteína verde fluorescente mejorada (eGFP) *loxP*-STOP-*loxP* (LSL) en células de fibroblastos de ratón NIH3t3 vivas (NIH3t3: células LSL-eGFP) como un indicador de la captación celular (Figura 4a). Este sistema es riguroso, ya que la activación de la fluorescencia verde requiere que la proteína Cre exógena entre en la célula, se someta a una translocación nuclear y extirpe el fragmento LSL del transgén. Esto debe ocurrir en células vivas y no ser tóxico para la expresión posterior de eGFP. Sin embargo, este proceso requiere que solo se administre una molécula funcional de recombinasa Cre para activar eGFP, por lo que no permite la determinación de la cantidad precisa de carga administrada. Para superar este problema, las proteínas Cre se administraron a diluciones limitantes durante un tiempo de exposición corto (1 hora) y se determinó la dosis mínima requerida para activar la fluorescencia verde después de 48 horas (Figura 4c).

Transducción de NIH3t3: Las células LSL-eGFP con lentivirus SIN Cre para sobreexpresar Cre transgénicamente condujo a una activación casi completa ($92 \pm 6\%$; $p < 0,001$) de la expresión de eGFP en todas las células, lo que confirma la utilidad de este sistema (Figura 4b). Los beneficios del sistema de fluorescencia y las versiones fluorescentes administradas de la proteína Cre-recombinasa se conservaron mediante la purificación de proteínas con *mRFP1* clonado en el extremo N-terminal del ADNc de Cre. Tratamiento de NIH3t3: Las células LSL-eGFP con mR-Cre (mRFP fusionado a Cre) dieron como resultado la recombinación y la activación de eGFP ($22,1 \pm 6,7\%$; $p < 0,05$) a las dosis más altas (500 $\mu\text{g/ml}$) (Figura 4d). La activación de eGFP se inhibió a 4°C y se vio afectada negativamente por la concentración del suero de forma dependiente. mR-Cre-8R demostró que el 8R PTD mejoró la administración funcional de Cre ($\square 22$ veces; $p < 0,01$).

La proteína GET/proteína HETD, P21-mR-Cre-8R, requirió tan solo un minuto de incubación con células a una dosis baja (1 $\mu\text{g/ml}$) para provocar la recombinación ($4,3 \pm 2,5\%$; $p < 0,05$) confirmando que la unión y la internalización es un proceso eficiente y rápido. Para una dosis moderada (10 $\mu\text{g/ml}$), la GET/transducción mediada por HETD logró una administración funcional de ~ 15 veces ($p < 0,01$) por encima de los niveles de PTD solo y recombinó completamente todas las células NIH3t3: LSL-eGFP (Figura 4d,e). Es importante destacar que esta actividad fue $\square 340$ veces mejor que mR-Cre ($p < 0,001$). Se repitieron los experimentos con heparinasa III, heparina libre y sin suero utilizando el sistema de recombinación Cre. Se confirmó que el pretratamiento con heparinasa III reducía la recombinación a niveles basales y que el suero del medio desempeña un papel en la reposición de GAG de la membrana celular agotados por la heparinasa. En general, estos datos se correlacionan bien con las conclusiones de administración de fluorescencia y muestran una sinergia entre los restos P21 y PTD para lograr aumentos significativos en la transducción funcional de la carga de proteínas.

La proteína GET entre en las células mediante la macropinocitosis de balsas lipídicas

Previamente, se ha demostrado que la internalización mediada por PTD es a través de macropinocitosis en lugar de otras vías endocíticas {Wadia, 2004 N.º 25}. A continuación, se determinó si la captación celular de proteínas GET/proteínas HETD se produce a través de una vía endocítica específica que emplea el sistema de ensayo de Cre. La eliminación del colesterol de la membrana plasmática celular altera varias vías endocíticas mediadas por balsas lipídicas, incluyendo caveolas y la macropinocitosis {Anderson, 1998 N.º 29; Nichols, 2001 N.º 30; Liu, 2002 N.º 28}. Las células NIH3t3:LSL-eGFP tratadas con metil- β -ciclodextrina y nistatina se usaron para reducir o secuestrar el colesterol, respectivamente, y después transdujeron proteínas marcadas con HETD. Tanto la alteración de metil- β -ciclodextrina (Figura 17a) como de nistatina (Figura 17b) de las balsas lipídicas dieron como resultado una inhibición de la administración funcional dependiente de la dosis. Estos datos demuestran que la transducción mediada por GET/HETD requiere específicamente endocitosis mediada por balsas lipídicas.

La macropinocitosis es una forma rápida dependiendo de las balsas lipídicas e independiente del receptor de la endocitosis que requiere protuberancias de la membrana de actina que se envuelven en vesículas denominadas macropinosomas {Nichols, 2001 N.º 30; Liu, 2002 N.º 28; Conner, 2003 N.º 22}. Para confirmar que la macropinocitosis era de hecho, el mecanismo endocítico de la transducción mediada por HETD, las células se pretrataron con compuestos que inhiben la macropinocitosis (Figura 11a,b). La amilorida es un inhibidor específico del intercambio de Na^+/H^+ requerido para la macropinocitosis {West, 1989 N.º 31}. La citocalasina D es un inhibidor del alargamiento de la F-actina que se requiere para las protuberancias de la membrana unidas a macropinosomas {Sampath, 1991 N.º 32}. La amilorida y la citocalasina D no alteraron la unión celular de las proteínas HETD, pero dieron como resultado una reducción dependiente de la dosis de la transducción funcional en las células (Figura 17c y 17d, respectivamente). Estos datos confirman que P21 mejora la ruta macropinocítica utilizada por PTD para internalizar moléculas de carga.

La administración por GET promueve la macropinocitosis general

Se investigaron los efectos de la unión a GET/unión a HETD sobre la inducción de macropinocitosis. Se ha demostrado anteriormente que la transducción mediada por PTD promueve la captación de otras proteínas mediante un aumento en el nivel general de macropinocitosis {Wadia, 2004 N.º 25}. Las células se incubaron con un productor de macropinocitosis en fase fluida fluorescente, dextrano neutro de 70 kDa marcado con FITC, en combinación con la proteína GET/HETD, P21-mR-8R (Figura 18). Otros estudios {Oliver, 1984 N.º 24; Araki, 1996 N.º 23; Wadia, 2004 N.º 25} han demostrado que los dextrans neutros son absorbidos por macropinocitosis sensible a amilorida. P21-

mR-8R indujo un aumento significativo dependiente de la dosis en la captación de dextrano en fase líquida sobre los niveles de control en estado estable. Se comparó la actividad marcada con PTD frente a la actividad marcada con GET/HETD para estimular esta macropinocitosis. P21-mR-8R mejoró la captación de FITC-dextrano $\square 2,5$ veces ($p < 0,05$) sobre la estimulación alcanzada por la misma concentración de mR-8R que demuestra que el acoplamiento con HS-GAG a través de P21 y su efecto posterior en la transducción mediada por PTD estimula la captación macropinocítica.

Las cantidades significativas de proteína administrada por GET se atrapan en los endosomas que pueden liberarse eficientemente con cloroquina

La mayoría de las moléculas administradas por PTD permanecen atrapadas en macropinosomas incluso después de una incubación adicional, lo que indica que la liberación de estas vesículas es ineficiente. Si las cantidades de administración ajustadas y graduadas se controlan, entonces sería beneficioso si la mayoría de las proteínas internalizadas se consideraran funcionales. Las células se trataron con cloroquina, un inhibidor de la ATPasa de transporte de iones que altera los endosomas al prevenir su acidificación [Seglen, 1979 N.º 33] (Figura 17e). Se ha demostrado que dosis similares mejoran significativamente la administración funcional de proteínas administradas por PTD [Wadia, 2004 N.º 25]. Las dosis subcitotóxicas de cloroquina (100 μ M) dieron como resultado un aumento marcado ($95,3 \pm 4,8$ veces; $p < 0,001$) en la administración de proteínas marcada con HETD/por GET funcional a una dosis por debajo del umbral (0,1 μ g/ml), lo que indica que este punto en la ruta sigue siendo un problema importante que debe resolverse para la aplicación medicinal de GET/HETD. Sin embargo, el sistema de administración por GET/administración por HETD fue tan eficiente que con el tratamiento con cloroquina se obtuvieron niveles significativos y medibles de recombinación ($4,8 \pm 2,9$ %; $p < 0,05$) con incubaciones cortas (1 hora) de >10 pg/ml (Figura 17f). La combinación de la eficiencia de la administración por GET/HETD con tecnologías de escape endosómico puede permitir, por lo tanto, cantidades precisas y temporalmente controladas de la función de carga en las células.

La internalización mediada por GET es eficiente después de la asociación de la membrana celular

Incluso para las incubaciones que utilizan pequeñas cantidades de proteína GET se observaron cantidades funcionales de la actividad de proteína dentro de las células. Sin embargo, para demostrar de manera categórica y rigurosa que la mayoría de las proteínas GET, de hecho, se internalizaron de manera eficiente, se realizó una serie de análisis utilizando indicadores que responden a su localización celular o extracelular. Se utilizó HALO (Halo^{Tag}), que es una proteína de autoetiquetado derivada de DhaA²⁹. HALO forma rápidamente una unión covalente a ligandos sintéticos a base de cloroalcano; habiendo disponibles ligandos permeables e impermeables a las células. El etiquetado intraverso extracelular de HALO se confirmó utilizando la sobreexpresión transgénica de HALO sin etiquetar (para intracelular) y LAMP2b-HALO que se presenta en la membrana celular externa (para extracelular) y el etiquetado con ligandos permeables (HALO^{TAG} Oregon Green) o impermeables (HALO^{TAG} Alexafluor⁴⁸⁸) a las células (Figura 20). Las proteínas GET-HALO se construyeron y expresaron de forma recombinante (Figura 21a) y se administraron a las células para probar la internalización por sensibilidad al etiquetado con el ligando impermeable a las células. Una hora de incubación demostró que las proteínas GET permanecían principalmente localizadas extracelularmente y unidas a la membrana celular (Figura 21b). Sin embargo, con una incubación adicional (1 h de exposición con 5 h de incubación adicional; 1 h-5 h), la proteína GET (P21-HALO-8R) se internaliza de manera eficaz (sensible a ligando permeable a las células pero insensible a ligando impermeable) (Figura 21c). Estos experimentos se repitieron utilizando la variante mNectarine (mNect) de RFP, que es sensible al pH y pierde casi toda la fluorescencia en los entornos $< \text{pH} 6$ ³⁰ (Figura 22). De acuerdo con la transducción con HALO, mNect se mantuvo principalmente en la membrana localizada después de 1 h y su fluorescencia es sensible a la incubación del medio a pH ácido (pH 5,5) (Figura 22 d). Después de la incubación adicional posterior a la administración (1 h-5 h), la fluorescencia GET-mNect ya no era sensible al pH extracelular (Figura 22e); sin embargo, de manera interesante, los niveles absolutos de fluorescencia disminuyeron significativamente en comparación con GET-mR, probablemente debido al cambio de pH interno que la proteína está experimentando durante la acidificación endosómica¹. Estos datos demuestran que la asociación de las membranas de proteína GET es rápida y la transducción es eficaz después de la unión celular. Se planteó la hipótesis de que el aclaramiento de la membrana de la proteína GET podría ser una etapa limitante de la velocidad en el proceso de administración y esto se probó realizando múltiples transducciones (1 h) de GET-mR que varían el tiempo entre las transducciones (Figura 23a). De hecho, la retransducción directamente después de la transducción inicial disminuye la eficacia de la segunda transducción, sin embargo, se requiere tan poco como 1 h entre nuevas transducciones para obtener una eficiencia máxima de la retransducción (Figura 23b).

La administración por GET promueve la supervivencia por la resistencia a la selección de antibióticos conferida por NEO

El sistema GET/HETD parecía ser capaz de administrar cantidades significativas de molécula de varios órdenes de magnitud mejor que la proteína no marcada. A continuación, se buscó probar si el sistema podía ofrecer una actividad proteica prolongada y se diseñó un sistema para intentar proporcionar resistencia a las células bajo la selección de antibióticos (Figura 5). Se cree que este es un ensayo más reflexivo de la administración sostenida y la función de las cargas GET/HETD que se requerirían para la traducción clínica. A diferencia de lo basado en Cre, que

requiere que se entregue una sola enzima una vez en las células para que la eGFP se indique como "éxito", el ensayo a base de NEO requiere una administración sostenida durante varios días y cantidades significativas para anular la actividad del antibiótico. Sulfato de G-418 (Geneticina), un antibiótico aminoglucósido, que bloquea la síntesis de polipéptidos al inhibir el alargamiento de la cadena [Eustice, 1984 N.º 69].

Para ensayar esto, tanto las células MEF como las NIH3T3 se sometieron a un protocolo de selección en el que las células se sembraron y se sometieron a tres días consecutivos de transducción con una carga NEO por GET/HETD, P21-mR-NEO-8R. Las células se volvieron a colocar en placas y se seleccionaron simultáneamente con G-418 y la transducción de NEO por GET/HETD en curso durante tres días adicionales (Figura 5a). Después de la selección, estos cultivos se evaluaron para determinar el número de células restantes, la viabilidad con exclusión de azul de tripano, y se tiñeron utilizando calceína AM/homodímero de etidio 1 para marcar las células LIVE/DEAD, respectivamente. Estas se compararon con las células procesadas bajo el mismo régimen, pero se transdujeron con un lentivirus que expresa NEO, SIN NEO, que representa el enfoque transgénico convencional para conferir resistencia a G-418.

Estos datos revelaron una supervivencia dependiente de la dosis de células seleccionadas con P21-mR-NEO-8R transducida (Figura 5b). Esta supervivencia fue comparable a la conferida transgénicamente por la integración de SIN NEO (supervivencia $\square 3,6$ veces mejor; $p < 0,05$) cuando se administró P21-mR-NEO-8R a dosis altas con dosis más bajas de G-418 (supervivencia $\square 3,3$ veces mejor; $p < 0,05$) (Figura 5c-e). Las dosis más altas de G-418 solo podrían negarse por la transgénesis de SIN NEO. Tomados en conjunto, estos experimentos proporcionan una prueba del principio de que la proteína administrada por GET/HETD puede proporcionar una administración sostenida de cantidades significativas de molécula y puede promover la supervivencia de células de mamífero bajo una selección de antibióticos estricta.

La administración por GET de NANOG promueve la auto-renovación de la pluripotencia

Si esta tecnología se adopta para aplicaciones clínicas, entonces es importante demostrar su uso para alterar el destino celular, así como controlar el metabolismo celular. Una aplicación potencialmente importante de esta tecnología sería la conducción de la reprogramación, la auto-renovación y la diferenciación de las células madre. La tecnología iPSC se ha desarrollado rápidamente para permitir tecnologías basadas en ADN no integrador del genoma [Yu, 2011 N.º 91], ARN [Warren, 2010 N.º 4] y en proteínas [Kim, 2009 N.º 71; Zhou, 2009 N.º 72] para reemplazar los protocolos retrovirales originales [Takahashi, 2007 N.º 82]. Como ya se ha demostrado la reprogramación mediada por la administración por PTD, se intentó demostrar que la administración por HETD era traducible para promover el destino de las células pluripotentes [Kim, 2009 N.º 71; Zhou, 2009 N.º 72] (Figura 6).

Para ensayar esta hipótesis, se emplearon CGR-8 mESC para determinar si la administración por mediada por GET/HETD puede sostener su fenotipo de auto-renovación pluripotente con la retirada del factor inhibidor de la leucemia (LIF). Se administraron cargas NANOG por GET/HETD en un ensayo [Dixon, 2010 N.º 16] similar al utilizado para aislar inicialmente el papel de *Nanog* en mESC [Chambers, 2003 N.º 70]. Las células CGR-8 se colocaron en placas sobre plástico gelatinizado y se sometieron a tres días consecutivos de transducción con una carga NANOG por GET/HETD, P21-mR-NANOG-8R, se pasaron y tres pases adicionales (tres días por pase) continuando la transducción diaria en condiciones que carecen de LIF (Figura 6a). Estos cultivos se evaluaron en cada pase para determinar el número de células y después del tercer pasaje deficiente en LIF, se evaluaron para determinar el cambio morfológico, la actividad de la fosfatasa alcalina (AP) y mediante QPCR para determinar la expresión génica asociada a la pluripotencia y la diferenciación (*Oct4*, *Rex1* y *Fgf5*, respectivamente). Estos se compararon con células transducidas con lentivirus que expresan *N4NOG*, SIN NANOG, que se ha demostrado previamente que rescatan la auto-renovación de células CGR-8 en el mismo ensayo [Dixon, 2010 N.º 16].

Estos datos revelaron que P21-mR-NANOG-8R rescató la actividad de AP en números significativos de CGR-8 incluso con dosis relativamente bajas (5-10 $\mu\text{g/ml}$) (Figura 6b). La actividad de AP en las muestras de dosis altas de P21-mR-NANOG-8R fue similar a la lograda por el producto transgénico SIN NANOG. Los productos transgénicos y las células CGR-8 transducidas con P21-mR-NANOG-8R a dosis alta proliferaron a un nivel similar en cultivos deficientes en LIF ($\square 87,6$ veces más; $p < 0,001$) (Figura 6c) y también conservaron la expresión de *Oct4* a nivel similar (aunque inferior a los cultivos que contienen LIF), indicativo de retención de pluripotencia (ambos $p < 0,05$) (Figura 6d). Como se ha observado previamente, las células rescatadas por los métodos tanto de ADN como de proteínas regularon positivamente la expresión de *Fgf5* y regularon negativamente la expresión de *Rex1*, lo que indica un fenotipo de transición de ICM a epiblasto [Dixon, 2010 N.º 16]. Estos experimentos proporcionan una demostración de que la proteína administrada por GET/HETD puede prevenir la diferenciación y retener el fenotipo pluripotente que después se puede aplicar a la tecnología iPSC.

La administración por GET de MYOD impulsa la miogénesis

Para cumplir la promesa de la tecnología iPSC para la medicina regenerativa o el modelado de enfermedades, es imperativo que se aproveche el potencial de diferenciación multilínea de las células pluripotentes [Robinton, 2012 N.º 30]. Aunque se ha avanzado en la dirección de la diferenciación de estas células a diversos linajes mediante la modulación del medio de citocinas extracelulares, dichos protocolos siguen siendo relativamente ineficientes. Dada

la alta eficiencia de la administración de carga mediada por PTD funcional mediante la mejora de P21, se razonó que la tecnología GET/HETD también podría utilizarse para redirigir las células pluripotentes hacia destinos celulares diferenciados más allá de lo ya descrito para la transducción de factores de transcripción {Do Kwon, 2005 N.º 74; Hidema, 2012 N.º 75; Liang, 2013 N.º 73}.

Para esto, se usó la administración del factor miogénico MYOD eficaz {Bichsel, 2013 N.º 92} para impulsar la especificación del músculo esquelético (Figura 7). Para ensayar esta hipótesis, se diseñó un protocolo de diferenciación *in vitro* en el que las células HUES7 se colocaron en placas de gelatina y se retiró el medio convencional. En estas condiciones, las células se sometieron a siete días consecutivos de transducción con una carga de MYOD por GET/HETD, P21-mR-MYOD-8R, seguido de tres días adicionales de cultivo en condiciones con bajas concentraciones de suero de caballo (Figura 7a). Estos cultivos se evaluaron para determinar el cambio morfológico, se inmunotifieron para el marcador miogénico MIOGENINA, se evaluaron para determinar la multinucleación ligada a miógeno mediante tinción con DAPI y por QPCR para la expresión génica miogénica (*MYOD* y *ACTA1* endógenas). Estas se compararon con las células procesadas bajo el mismo régimen, pero se transdujeron con un lentivirus que expresa *MYOD*, SIN *MYOD*.

Estos datos revelaron un alto porcentaje de grandes miotubos positivos a MIOGENINA multinucleados ($62,1 \pm 8,9\%$; $p < 0,01$) (Figura 7b-f) que tenían una expresión de *MYOD* y *ACTA1* elevada ($p < 0,01$ y $< 0,05$, respectivamente) (Figura 7c). Esto fue comparable a la diferenciación observada en el producto transgénico SIN *MYOD* cuando P21-mR-MYOD-8R se administró en dosis altas. Tomados en conjunto, estos experimentos proporcionan una prueba del principio de que la proteína administrada por GET/HETD puede dirigir el destino de las células HUES7 a un tipo de célula somática diferenciada terminalmente.

Discusión

Al combinar un dominio de transducción de proteínas (PTD) con un péptido de unión a la membrana celular, tal como un péptido de unión a HS-GAG (HBD), para mejorar el direccionamiento de la membrana celular, se ha desarrollado una tecnología que permite una administración altamente eficiente de proteínas funcionalmente relevantes para dirigir una diversidad de comportamientos celulares, incluso en tipos celulares difíciles de transducir. Se demostró que el sistema GET/HETD puede aprovecharse para promover la supervivencia, la auto-renovación o dirigir la diferenciación de las células pluripotentes hacia un linaje deseado. Este sistema no es técnicamente complejo, como para los sistemas de ARN modificado {Warren, 2010 N.º 4}, y ofrece varias ventajas clave sobre las técnicas establecidas para administrar la función exógena de un gen o proteína. Además, al obviar la contención biológica estricta requerida para los enfoques de terapia génica viral, la tecnología de transducción de proteínas impulsada por GET/HETD debería hacer que dichos enfoques sean más accesibles.

Más fundamentalmente, debido a que la tecnología está basada en proteínas, elimina completamente el riesgo de integración genómica y la mutagénesis de inserción inherente a todas las metodologías a base de ADN {Gump, 2007 N.º 39}. Además, si se puede mejorar el escape endosómico, este enfoque permitirá que la estequiometría de las proteínas se regule estrechamente en los cultivos. Esto evitará la variación estocástica en la expresión típica de los vectores de integración, así como los efectos incontrolables del silenciamiento viral. La tecnología GET/HETD también puede aplicarse directamente a las tecnologías de reprogramación. Dado el carácter gradual de los cambios fenotípicos observados durante la inducción de la pluripotencia {Chan, 2009 N.º 63; Smith, 2009 N.º 64} y para los protocolos de diferenciación dirigida {Burridge, 2011 N.º 81}, parece probable que los factores de transcripción individuales desempeñen roles distintos para cada etapa.

El potencial sin precedentes para el control temporal sobre la función del factor individual que ofrece la tecnología GET/HETD debería permitir probar estas variables para mejorar la eficiencia y la cinética del control del destino celular.

El carácter transitorio y no mutagénico de la transducción a base de proteínas también podría ofrecer importantes beneficios clínicos además de los investigados aquí. De hecho, el uso de la transducción de proteínas para expresar antígenos de cáncer o patógenos para la inmunoterapia {Rabinovich, 2009 N.º 67} puede beneficiarse de las propiedades no inmunogénicas de la transducción de proteínas.

La mayoría de las proteínas administradas pueden quedar atrapadas en el interior del endosoma. El campo del PTD se centró en los aspectos mecanicistas de TAT y otras interacciones de PTD y el escape de los macropinosomas con el objetivo de mejorar la liberación de carga de las vesículas {Heitz, 2009 N.º 42}. El problema se abordó desde otro ángulo con el objetivo de administrar proteínas más allá de lo que se puede lograr con los PTD y su avidez hacia la superficie celular.

Estudios previos que administraron TAT-Cre sugirieron que la etapa limitante de la velocidad para la administración eficaz mediada por PTD de una carga funcional es el escape de macropinosomas, sin embargo, estos datos sugieren que aunque este proceso de escape finalmente controlará si los PTD se usan con éxito para tratar una enfermedad {Sugita, 2007 N.º 80}, que el propio proceso de transducción por PTD no es el más eficiente lo que éste podría ser fisiológicamente. La transducción mediada por GET/HETD descrita aquí mejora los sistemas actuales en

hasta tres órdenes de magnitud para las células difíciles de transducir. La unión con el escape de vesículas con el sistema GET/HETD será un desarrollo significativo. Como prueba de concepto, esto se demostró mediante el uso del disruptor endosómico general, la cloroquina. Al disminuir la integridad del macropinocitoma durante la transducción GET/HETD se demostró la administración de proteínas utilizando concentraciones en pg/ml (Figura 17f).

La presente comprensión de la administración mediada por PTD consiste en la hipótesis de que un bosque denso de GAG proporciona la membrana celular con una carga negativa ubicua a los que se une el PTD {Gump, 2007 N.º 39}. El cambio en la carga afecta a esta unión, pero es independiente de la capacidad de los PTD para transducir células o inducir la captación macropinocítica. La GET/HETD ha creado de manera eficaz una versión más exagerada de este fenómeno con proteínas marcadas que se unen con mayor avidez a las membranas celulares y promueven la transducción exitosa mediada por un PTD. Los HBD alternativos funcionan de manera similar a P21 con diferentes eficacias y actividades de tipo celular, dependiendo de su fuente de aislamiento. El reemplazo de 8R ha demostrado que se pueden emplear otros PTD (TAT, 8K, 8RQ) en una GET/HETD exitosa (Figura 11).

Se sabe que los GAG, tales como los HS-GAG, tienen diversas funciones biológicas y están ampliamente involucrados en muchos procesos fisiológicos y patológicos, tal como la coagulación de la sangre y las respuestas inflamatorias {Lortat-Jacob, 2002 N.º 53; Varki, 2008 N.º 52} a través de interacciones con una diversidad de proteínas que incluyen factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas {Sasisekharan, 2006 N.º 55; Gandhi, 2008 N.º 54}. Las interacciones dependen de la composición de disacáridos y los patrones de los GAG, que desempeñan un papel significativo en la regulación de diversos procesos biológicos. La heterogeneidad de los HS-GAG está determinada por los patrones de expresión de una diversidad de genes ligados y múltiples enzimas de edición de HS-GAG en diferentes afecciones patológicas {Lindahl, 1998 N.º 56; Nakato, 2002 N.º 57; Sasisekharan, 2002 N.º 60; Bengtsson, 2003 N.º 59; Gesslbauer, 2007 N.º 58}. Se ha informado que los procesos inflamatorios y enfermedades tales como mucopolisacaridosis, osteoartritis y cáncer de mieloma, se correlacionan con las diferentes estructuras de disacáridos de los GAG. Por lo tanto, la evaluación de las variaciones (es decir, la presencia y la cantidad) de GAG tiene un gran potencial para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades.

El descubrimiento de que la promoción de la interacción con GAG mejora significativamente la eficiencia de la carga macromolecular marcada con PTD biológicamente activa, abrirá nuevas vías para el tratamiento y la investigación experimental de la enfermedad.

Procedimientos generales

Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Se obtuvo ADNc para *mRFP1* (*mR*) como un donativo del Prof. R. Y. Tsien (University of California, EE.UU.) {Campbell, 2002 N.º 12}. Se sintetizaron ADNc *8R*, *TAT*, *8K*, *8RQ*, *P21*, *Cre*, *NANOG*, *MYOD* y *NEO de novo* (Eurofins MWG Operon). Los ADNc se clonaron en el vector de expresión pGEX6-PI (Novagen) para crear fusiones en marco y se expresaron proteínas en *Escherichia coli* BL21 (DE21) pLysS (Novagen). Se indujeron cultivos de LB que crecían exponencialmente ($DO_{600} = 0,4$) agitados a 220 rpm a 37 °C usando IPTG 1 mM durante 24 horas a 25 °C. Los sedimentos bacterianos se lisaron y se sometieron a sonicación (7 amplitudes, 1 minuto, 5 veces) en un tampón de extracción STE 1x (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM que contenía DTT 1 mM, 0,2 mg/ml de lisozima, y un cóctel de inhibidor de proteasas 1x). La proteína insoluble se recuperó utilizando el kit de solubilización y renaturalización de cuerpos de inclusión Rapid GST (AKR-110; Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA). Las proteínas recombinantes se purificaron mediante cromatografía de afinidad utilizando resina de glutatión-Sepharose (GE Healthcare). Se eliminaron las etiquetas GST y se eluyeron de la resina mediante la escisión de la proteasa PreScission™ (GE healthcare) en un tampón de escisión 1x (Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM y DTT 1 mM). La concentración de proteínas se determinó utilizando un ensayo de proteína a base de BCA (BioRad) con absorbancia medida a 595 nm utilizando proteína mR recombinante como patrón. La integridad y la expresión de proteínas de longitud completa se confirmaron mediante SDS-PAGE. La fluorescencia de las proteínas recombinantes (excitación: 584 nm; emisión: 607 nm) se determinó con todas las preparaciones <10 % de diferencia de intensidad entre muestras (fluorescencia/µg). Los estándares y las muestras se analizaron utilizando el lector multimodo TECAN infinite 200PRO. Las alícuotas se almacenaron a -80 °C.

Cultivo celular

Las células de fibroblastos de ratón NIH3T3, células de riñón embrionario humano HEK293T, células de mioblasto de ratón C2C12, células madre mesenquimales humanas inmortalizadas con iHMSC (creadas como se describe {Okamoto, 2002 N.º 8}) y fibroblastos embrionarios murinos MEF (cosechados como se describe {Anderson, 2007 N.º 9}) se mantuvieron en DMEM con medio de suero fetal bovino (FCS; Sigma) al 10 % (v/v) complementado con L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Las células madre embrionarias de ratón CGR-8 (mESC) y las *EXT1*^{-/-} mESC (una donación del Dr. DE Wells, University of Houston, EE.UU.; {Lin, 2000 N.º 78}) se mantuvieron en DMEM, FCS al 20 % (v/v), 1000 unidades/ml de factor inhibidor de leucemia (LIF), aminoácidos no esenciales, β-mecaptoetanol 100 µM (Sigma), L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Las células de cardiomiocitos de ratón HL1 se mantuvieron como se describe

{Claycomb, 1998 N.º 7}. Se cultivaron células madre pluripotentes embrionarias humanas HUES7 en inducidas IPS2 como se describe previamente {Dick, 2011 N.º 10}. Los fibroblastos humanos HUES7fib derivados de células HUES7 se generaron y se cultivaron como se describe previamente {Dick, 2011 N.º 10}. Todas las células se cultivaron a 37 °C en CO₂ al 5 %.

Citometría de Flujo y Microscopía

Para la citometría de flujo, las células se tripsinizaron (a menos que se indique otra cosa), se fijaron en PFA al 4 % (p/v), se resuspendieron en PBS (pH 7,5) y se analizaron en un citómetro de flujo MoFlo™ DP (DAKO) utilizando un láser verde a 488 nm. (50.000 células; activadas en células vivas por dispersión directa/lateral). La fluorescencia media se usó para determinar los análisis estadísticos con el fondo de las células no marcadas/transducidas sustraídas, y los valores se tomaron como relaciones con respecto al control experimental. Los datos mostrados son tres experimentos de muestras por triplicado. Para microscopía, los cultivos se aclararon dos veces con PBS y se tomaron imágenes con un microscopio de fluorescencia invertida (Nikon Eclipse TS100).

Ensayo de administración de fluorescencia

Para ensayar múltiples líneas celulares, se colocaron en placas 2 x 10⁵ células/pocillo (en placas de 12 pocillos) sobre la superficie relevante para la línea celular ensayada, se unieron células durante 2 horas y se transdujeron con proteínas recombinantes en medio de crecimiento específico de tipo celular. Después de la transducción, las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se fijaron en PFA al 4 % para citometría de flujo. Para la localización de la membrana, la localización intracelular o ambas, se colocaron en placas las células como anteriormente, pero los cultivos se incubaron previamente en medio sin suero durante 1 hora antes de la transducción. La localización de la membrana para evaluar la interacción celular se logró mediante una breve transducción de 1 hora en medio sin suero. La localización intracelular para evaluar la eficiencia de la transducción se logró mediante una transducción corta de 1 hora, seguida de una incubación de 5 horas en medio sin suero solamente. La asociación celular (membrana y niveles intracelulares) se evaluó mediante la transducción de las células durante 6 horas en medio sin suero. Para citometría de flujo, las células se tripsinizaron, se lavaron y se fijaron en PFA al 4 % y para la microscopía se tomaron imágenes de las células vivas después del lavado en PBS. Para el agotamiento de la tripsina de las proteínas de superficie celular, las células se trataron con tripsina/EDTA (Invitrogen) o una solución de disociación celular a base de EDTA (CDS) (Sigma) durante 15 minutos a 37 °C, seguido de lavados con PBS e inhibidor de la tripsina de soja 1x (10 mg/ml en PBS; Sigma). Después, las células se trataron con proteínas durante 1 hora a 37 °C en medio sin suero. Para el agotamiento del detergente de las membranas celulares, las células se trataron con PBS (pH 7,5) que contenía Triton-X100 (Tx100) al 0,1 % (v/v) durante 10 minutos a 37 °C, seguido de lavados con PBS. Después, las células se trataron con proteínas durante 1 hora a 37 °C en medio sin suero. Para el tratamiento con GAG, las células se trataron previamente con GAG en DMEM sin suero antes de la transducción y se incluyeron en el medio de transducción. Esto incluía heparina y sulfato de condroitina A, B y C (0-50 µg/ml).

Análisis de proteína administradas en total

Se colocaron en placas 5 x 10⁶ células NIH3t3 (en matraces T25), las células se preincubaron en DMEM sin suero durante 1 hora, y se transdujeron con mR-8R o P21-mR-8R (0-200 µg/ml; 1 ml de volumen) en DMEM sin suero durante 6 horas. Se utilizaron células NIH3t3 transducidas con lentivirus SIN-mR como control para los niveles alcanzados por los sistemas transgénicos {Dixon, 2011 N.º 15; Dick, 2011 N.º 10}. Las células se recogieron mediante tripsinización, se fijaron en PFA al 4 % para citometría de flujo o se lavaron varias veces en PBS frío con proteína soluble extraída en tampón de HKM frío (HEPES 20 mM, pH 7,5, KCl 5 mM, MgCl₂ 0,5 mM y DTT 0,5 mM con un cóctel de inhibidor de proteasa libre de EDTA completo 1x) para fluorometría {Medina, 2000 N.º 14}. Los extractos se sometieron por sonicación, se centrifugaron y se añadió NaCl para producir una concentración final de 100 mM antes de los análisis. Se usó fluorometría para comparar extractos solubles con proteína mRFP purificada diluida en tampón HKM con NaCl 100 mM como patrones. La citometría de flujo se utilizó para evaluar la proteína total administrada en células intactas.

Evaluación de agotamiento del medio

2 x 10⁶ células NIH3t3 o HUES7 HESC se colocaron en placas (en placas de 6 pocillos), se preincubaron células en DMEM sin suero durante 1 hora, y se transdujeron con proteínas recombinantes (20 µg/ml; 1 ml de volumen) en DMEM sin suero durante 12 horas. El medio se recogió y se utilizó fluorometría para comparar la fluorescencia restante en los versos de medio que antes de la incubación celular. La fluorescencia de la preincubación del medio se asignó como unidades de fluorescencia al 100 % y se restó el fondo del medio sin suero.

Ensayo de unión a heparina, tratamiento con heparinasa y agotamiento de las moléculas de unión a P21 del suero

Para la actividad de unión a heparina, se incubó 1 ml de proteínas recombinantes (20 µg/ml) en DMEM con 50 µl de perlas de heparina-sepharose (Sigma) lavadas con PBS durante 1 hora a 37 °C con agitación a 100 rpm. El medio previo y posterior a la incubación se comparó por fluorometría. Para el tratamiento con heparinasa, se colocaron

células NIH3t3 en placas a 2×10^5 /pocillo (en placas de 12 pocillos) y se preincubaron en medio sin suero durante 1 hora con heparinasa III (0-1 U/ml) o heparina (0-50 µg/ml). Después, las células se lavaron y se transdujeron con mR o P21-mR-8R (20 µg/ml en medio libre de suero o medio con diferentes concentraciones de FCS) que contenían heparinasa III o heparina durante 12 horas. El FCS se agotó del material de unión a P21 mediante cromatografía de afinidad. Esto se logró mediante la incubación de 50 ml de FCS con 2 ml de resina de glutatión-sepharose (GE Healthcare) preabsorbida con proteína GST-P21 expresada en *Escherichia coli*.

Evaluación de la macropinocitosis

Para medir los efectos de la transducción de proteínas en la macropinocitosis general, las células se incubaron con 100 µg/ml de dextrano neutro FITC-70 kDa (Sigma), junto con diferentes proteínas recombinantes (0-10 µg/ml) durante 1 hora a 4 °C o 37 °C. Las células se tripsinizaron y se lavaron en PBS antes de los análisis por citometría de flujo.

Ensayo de recombinación de Cre

Para medir la actividad de la Cre recombinasa, se creó la línea celular NIH3t3:LSL-eGFP utilizando la transfección del plásmido pZ/EG y la selección de G-418 {Novak, 2000 N.º 6}. Para confirmar que la actividad de Cre condujo eficazmente a la recombinación y la activación de eGFP, las células se transdujeron con lentivirus SIN-Cre (como se describe en Dixon et al. 2011) y se confirmó que >95 % de las células eran positivas para eGFP 48 horas después de la transducción. Se colocaron en placas 2×10^5 células/pocillo (en placas de 12 pocillos), se preincubaron en DMEM sin suero durante 1 hora y se trataron con proteínas Cre (0-500 µg/ml) en DMEM sin suero. Después de la incubación con Cre, las células se tripsinizaron, se volvieron a colocar en placas en medio completo y se incubaron durante 2 días. Las células se pretrataron con fármacos durante el periodo de tiempo indicado en DMEM sin suero, se incluyeron en medio de transducción de Cre y se añadieron después de la recolocación en placas. Pretratamientos incluidos: heparina (0-50 µg/ml), sulfato de condroitina A, B y C (0-50 µg/ml), cloroquina (0-100 µM), citocalasina-D (0-10 µM), amilorida (0-5 mM), metil-β-ciclodextrina (0-5 mM) y nistatina (0-50 µg/ml). Después de las incubaciones, las células se tripsinizaron, se lavaron, se fijaron en PFA al 4 % y el % de células recombinadas se determinó mediante citometría de flujo. Para las comparaciones de mR-Cre-8R y P21-mR-Cre-8R, se utilizaron concentraciones de 100 µg/ml y 10 µg/ml, respectivamente, y los datos se expresaron como % de recombinación máxima (es decir, el % relativo a la recombinación máxima alcanzada con la dosis iniciada de Cre).

Ensayo de resistencia a antibióticos de NEO

Para medir la actividad de NEO, se evaluó la supervivencia y proliferación de NIH3t3 y MEF en presencia de la selección de antibiótico G-418. Se midieron el número de células, la viabilidad y las relaciones de células vivas/muertas. Para confirmar que la actividad de NEO conduce de manera eficiente a la supervivencia y la proliferación bajo la selección de G-418 de células NIH3t3 y MEF, las células se transdujeron con lentivirus SIN-NEO (como se describe en Dixon et al. 2009) y confirmaron que la transducción de NEO previene la muerte celular y conserva la viabilidad bajo una selección de G-418. Esto se usó en comparaciones con transducciones de proteína NEO. Se colocaron en placas 3×10^5 células MEF/pocillo o 1×10^5 células NIH3t3/pocillo (en placas de 12 pocillos) y se cultivaron en DMEM con FCS al 10 % que contenía P21-mR-NEO-8R (0-100 µg/ml) durante 3 días. Las células se volvieron a colocar en placas a 3×10^5 células/pocillo para células MEF o 1×10^5 células/pocillo para células NIH3t3. Las células se cultivaron en DMEM con FCS al 10 % que contenía P21-mR-NEO-8R (0-100 µg/ml) y sulfato de G-418 (0-300 µg/ml) durante 3 días más alimentándose diariamente para destruir las células no resistentes. Las células se contaron, se evaluó la viabilidad utilizando la exclusión de azul de tripano o se ensayó utilizando la tinción LIVE/DEAD {Bayousssef, 2012 N.º 13}.

Ensayo de auto-renovación de NANOG

Para medir la actividad de NANOG, se usó la eliminación de LIF de las CGR-8 mESC y se midió la actividad de la fosfatasa alcalina (AP), los números de células y se evaluó los cambios en la expresión génica por PCR cuantitativa (QPCR). Para confirmar que la actividad de NANOG conduce de manera eficiente al rescate de la auto-renovación sin LIF, las células se transdujeron con lentivirus SIN-NANOG (como se describe en Dixon et al. 2009) y se confirmó que la auto-renovación de CGR-8 se rescató de manera eficiente y esto se usó en comparaciones con transducciones de proteínas NANOG. Se colocaron en placas 2×10^5 células/pocillo (en placas de 6 pocillos), se preincubaron en medio de crecimiento con LIF durante un pase/3 días que contenía P21-mR-NANOG-8R (0-50 µg/ml) alimentándose a diario con medio recién preparado. Las células se volvieron a colocar en placas a 2×10^5 células/pocillo (en placas de 6 pocillos) en medio de crecimiento sin LIF (y con LIF como controles) que contenía P21-mR-NANOG-8R (0-50 µg/ml). Las células se alimentaron diariamente con este medio y cada 3 días se contaron y pasaron repitiendo una décima parte de las células hasta 3 pases. Después del tercer pase, las células de retirada post-LIF se tiñeron para determinar la actividad de AP (86R-lkit; basado en Naftol AS-BI y LB de violeta rojo rápido; Sigma) o se procesaron para los análisis de QPCR. Los niveles de expresión relativos ($\Delta\Delta CT$) se determinaron mediante QPCR utilizando la mezcla maestra de expresión génica TaqMan™ y los ensayos específicos de expresión génica TaqMan™ (Applied Biosystems).

Ensayo de miogénesis de MYOD

Para medir la actividad de MYOD, se utilizó la diferenciación de las HUES7 HUESC y se evaluó la morfología celular, la multinucleación celular, los cambios en la expresión génica mediante PCR cuantitativa (QPCR) y la expresión de la proteína MIOGENINA. Para confirmar que la actividad de MYOD conduce de manera eficiente a la diferenciación miogénica de las HESC, se transdujeron células con lentivirus SIN-MYOD (como se describe en Dixon et al. 2009) y se confirmó que MYOD dirige la diferenciación de miotubos multinucleada que se usó en comparaciones con las transducciones de proteínas MYOD. Se colocaron 1×10^6 células/pocillo en placas recubiertas con gelatina al 0,1 % (en placas de 6 pocillos) y se cultivaron en DMEM con FCS al 10 % durante 1 semana con un pase usando tripsina. Las células se colocaron de nuevo en placas a 1×10^6 células/pocillo en placas recubiertas con gelatina al 0,1 % y se cultivaron en DMEM con FCS al 10 % que contenía P21-mR-MYOD-8R (0-50 µg/ml). Las células se alimentaron diariamente con este medio durante 7 días. Después, los medios de cultivo se cambiaron a DMEM con suero de caballo (HS) al 2 % y los cultivos se mantuvieron durante 7 días más. Después, las células se procesaron por QPCR o se fijaron en PFA al 4 % y se sometieron a inmunotinción {Bayousssef, 2012 N.º 13}. Los núcleos se marcaron utilizando DAPI como se describe previamente (Dixon et al. 2009). El porcentaje de núcleos positivos a MIOGENINA/núcleos totales se cuantificó, con un mínimo de 200 núcleos contados por condición. Los niveles de expresión relativos ($\Delta\Delta CT$) se determinaron mediante QPCR utilizando la mezcla maestra de expresión génica TaqMan™ y los ensayos específicos de expresión génica TaqMan™ (Applied Biosystems).

Administración de anticuerpos, ácidos nucleicos y nanopartículas

Anticuerpos de cabra biotinilados anti-conejo y de FITC-conejo anti-ratón (Sigma), pSIN-GFP (Dixon et al. 2014), ARN de nucleótido modificado (modRNA) para GFP (Miltényi Biotech) y ARNsi marcado con FAM contra GAPDH (Sigma), y nanomag-D (250 nm) (MircoMod) se complejaron con proteínas o péptidos GET y se añadieron a las células. Para los anticuerpos, se permitió que se formaran complejos en medio de crecimiento durante 20 minutos antes de la adición celular. Para los ácidos nucleicos, se utilizó una relación de carga de péptido:ácido nucleico 2:1 para la complejación. La transfección con GET o LIPO2000 (lipofectamine 2000; Invitrogen) usó 10 µg o 1 µg de ácido nucleico por transfección de 100.000 hMSC en placas de 12 pocillos. LIPO2000 sustituido con péptido GET siguiendo las instrucciones exactas del fabricante. Para MNP, se utilizó una concentración final de péptido 25 µM en una reacción EDAC/NHS utilizando 2 mg de MNP según las instrucciones del fabricante. El azul de Prusia se llevó a cabo utilizando ferrocianuro de potasio (2,5 % p/v) en HCl al 2,5 % p/v.

Análisis estadístico

Las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando el paquete de software GraphPad Prism. Las comparaciones se realizaron utilizando el análisis de varianza de Tukey-Kramer (ANOVA). Los resultados se consideraron significativos si $p < 0,05$.

Secuencias ejemplares

Secuencias de unión a HS-GAG ejemplares

Secuencia de aminoácidos P21

(SEQ ID NO. 1)

KRKKKGKGLGKKRDPCLRKYK

Secuencia de nucleótidos P21 (con una metiona/ATG):

(SEQ ID NO: 2)

aagcgcaagaagaagggaaggcctgggcaagaagcgcgatccgtgcctgcgcaagtataag

Secuencia de aminoácidos PDGF (194-211):

(SEQ ID NO. 3)

G R P R E S G K K R K R K R L K P T

Secuencia de nucleótidos PDGF (194-211):

(SEQ ID NO: 4)

ggccgcccgcgcgaaagcggcaaaaaacgcaaacgcaaacgcctgaaaccgacc

Secuencia de aminoácidos FGF7B:

(SEQ ID NO. 5).

T Y A S A K W T H N G G E M F V A L N Q

Secuencia de nucleótidos FGF7B:
(SEQ ID NO: 6)

Acctatgcgagcgcgaaatggacccataacggcggcgaaatgtttgtggcgctgaaccag

Secuencia de aminoácidos FGF2 HBD B(247-262):
(SEQ ID NO: 7).

5 T Y R S R K Y T S W Y V A L K R

Secuencia de nucleótidos FGF2 HBD B(247-262):
(SEQ ID NO: 8)

acctatgcgagcgcgaaatataaccagctggtatgtggcgctgaaacgc

10 **Nucleótidos que codifican la secuencia del dominio de transducción de proteína 8R:**
(SEQ ID NO: 9)

CGA AGA CGC AGG AGA CGT CGA AGG

Secuencia de nucleótidos de la molécula de administración ejemplar (P21-carga-8R):
(SEQ ID NO: 10)

aagcgcaagaagaaggcgcaaggcctgggcaagaagcgcgatccgtgcctgcgcaagtataagNcgaagacgcagga

15 gacgtcgaagg

N = secuencia de ácido nucleico de carga de diversa longitud (es decir, el número de residuos de nucleótidos puede variar), u otra entidad molecular.

20 Se crearon dos versiones de cada una de las variantes de nanocuerpo de los anticuerpos ScFv; una con una secuencia idéntica al dominio ScFv vHH (dominio de marco 1-CDR1-dominio de marco 2-CDR2-dominio de marco 3-CDR3-dominio de bisagra IgA/dominio de marco 4) y una en la que los dominios CDR1, 2 y 3 se injertaron en una secuencia de dominio vHH genérica. Ambas versiones tienen una actividad comparable y la versión de injerto se creó para probar que el simple injerto de los dominios CDR en un anticuerpo genérico también funciona.

25 A continuación se muestran las secuencias de HS4C3, y AO4BO8 ScFv vHH y vHH injertado:

HS4C3 ScFv vHH

(SEQ ID NO: 11)

EVQLVESGGGLVQPRGSLRLSCAASGFTVSSNEMSWIRQAPGKGLEWVSSISGG
STYYADSRKGRFTISRDNSKNTLYLQMNNLRAEGTAAYYCGRRLKDPSTPPTPS
PSTPPTSPS

30 CDR1 GFTVSSNE
CDR2 ISGGST
CDR3 GRRLKD

35 Secuencia de nucleótidos HS4C3 ScFv vHH
(SEQ ID NO: 12)

gaagtgcagctggtgaaagcggcgggcggcctggtgcagccgcgcggcagcctgcgcctgagctgcgcggcgagcgg
ctttaccgtgagcagcaacgaaatgagctggattcgccaggcgccgggcaaaggcctggaatgggtgagcagcattagcg
gcggcagcacctattatgcggatagccgcaaaggccgctttaccattagccgcgataacagcaaaaacacctgtatctgca
gatgaacaacctgcgcgcggaaggcaccgcggcgtattattgcggccgcgcctgaaagatccgagcaccgccgacc
ccgagcccgagcaccgccgaccccgagcccgagc

vHH injertado en HS4C3
(SEQ ID NO: 13)

QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCTASGFTVSSNELGWFRQAPGQERWAVAAISG
GSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVTLQMNNLKPEDTAIYYCGRRLKDWGQGTQ
 VTVSSPSTPPTPSPSTPPTSPS

CDR1 GFTVSSNE
 CDR2 ISGGST
 CDR3 GRRLKD

5

nucleótido vHH injertado en HS4C3
 (SEQ ID NO: 14)

caggtgcagctggtggaaagcggcggcgagcgtgcaggcggcgagcctgcgcctgagctgcaccgcgagcgg
 ctttacctgtagcagcaacgaactgggtggtttcgccaggcggcgccagggaacgctggcggtggcgcgattagc
 ggcggcagcacctattatgcggatagcgtgaaaggccgctttaccattagccgcgataacgcgaaaaacacgtgacctg
 cagatgaacaacctgaaaccggaagataccgcgattattattgcggccgcgcctgaaagattggggccagggcaccca
 ggtgacctgtagcagcccgagcaccgcggaccccgagcccgagcaccgcggaccccgagcccgagc

10 AO4B08 ScFv vHH

(SEQ ID NO: 15)

EDQLVESGGGLVQPGGSLRPSCAASGFAFSSYALHWVRRAPGKGLEWVSAIGT
GGDTYYADSVMGRFTISRDNAKKSLYLHMNSLIAEDMAVYYCSLRMNGWRAH
QPSTPPTPSPSTPPTSPS

CDR1 GFAFSSYA (SEQ ID NO: 22)
 CDR2 IGTGGDT (SEQ ID NO: 24)
 CDR3 SLRMNGWRAHQ (SEQ ID NO: 26)

15

Secuencia de nucleótidos AO4B08 ScFv vHH
 (SEQ ID NO: 16)

gaagatcagctggtggaaagcggcggcgagcctggtgcagccggcgagcctgcgcccagctgcgcggcgagcgg
 ctttgcgttagcagctatgcgctgcattgggtgcgcgcgcgcggcgaaaggcctggaatgggtgagcgcgattggcac
 cggcggcgatacctattatgcggatagcgtgatggcgccgtttaccattagccgcgataacgcgaaaaaagcctgtatctg
 catatgaacagcctgattgcggaagatatggcggtgtattattgcagcctgcgcatgaacggctggcgcgcgcatcagccg
 agcaccgcggcagcccgagcccgagcaccgcggaccccgagcccgagc

20 vHH injertado en AO4B08

(SEQ ID NO: 17)

QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCTASGFAFSSYALGWFRQAPGQERWAVAAIGT
GGDTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVTLQMNNLKPEDTAIYYCSLRMNGWRAH
QWGQGTQVTVSSPSTPPTPSPSTPPTSPS

CDR1 GFAFSSYA (SEQ ID NO: 22)
 CDR2 IGTGGDT (SEQ ID NO: 24)
 CDR3 SLRMNGWRAHQ (SEQ ID NO: 26)

25

Secuencia de nucleótidos vHH injertado en AO4B08
(SEQ ID NO: 18)

cagggtgcagctggtggaagcggcggcgaggcagctgcaggcggcgaggcagcctgcgcctgagctgcaccgcgagcgg
ctttgcgttttagcagctatgcgctgggctggttcgccaggcgccgggcccaggaacgctgggcggtggcgggcgattggca
ccggcgggcgatacctattatgcggatagcgtgaaaggccgctttaccattagccgcgataacgcgaaaaacaccgtgaccc
tgcagatgaacaacctgaacccggaagataccgcgattattattgcagcctgcgcataaacggctggcgcgcgcatcagt
ggggccagggcacccaggtgaccgtgagcagcccgagcaccggcgaccccgagcccagcaccggcgaccccgaccc
gagcccgagc

Bibliografía:

- 5 1. Gump JM & Dowdy SF (2007) TAT transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects. *Trends in molecular medicine* 13(10):443-448.
2. El-Andaloussi S, Holm T, & Langel U (2005) Cell-penetrating peptides: Mechanisms and applications. *Curr Pharm Design* 11(28):3597-3611.
- 10 3. Goun EA, Pillow TH, Jones LR, Rothbard JB, & Wender PA (2006) Molecular transporters: Synthesis of oligoguanidinium transporters and their application to drug delivery and real-time imaging. *Chembiochem* 7(10):1497-1515.
4. Meade BR & Dowdy SF (2007) Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides. *Adv Drug Deliver Rev* 59(2-3):134-140.
- 15 5. Fischer R, Fotin-Mieczek M, Hufnagel H, & Brock R (2005) Break on through to the other side - Biophysics and cell biology shed light on cell-penetrating peptides. *Chembiochem* 6(12):2126-2142.
6. Nakase I, Takeuchi T, Tanaka G, & Futaki S (2008) Methodological and cellular aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Adv Drug Deliver Rev* 60(4-5):598-607.
7. Heitz F, Morris MC, & Divita G (2009) Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Brit J Pharmacol* 157(2):195-206.
- 20 8. Gump JM, June RK, & Dowdy SF (2010) Revised Role of Glycosaminoglycans in TAT Protein Transduction Domain-mediated Cellular Transduction. *J Biol Chem* 285(2): 1500-1507.
9. Norbury CC, Flewett LJ, Prescott AR, Shastri N, & Watts C (1995) Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity* 3(6):783-791.
- 25 10. Meier O, et al. (2002) Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J Cell Biol* 158(6):1119-1131.
11. Conner SD & Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422(6927):37-44.
12. Wadia JS, Stan RV, & Dowdy SF (2004) Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med* 10(3):310-315.
- 30 13. Skehel JJ, Cross K, Steinhauer D, & Wiley DC (2001) Influenza fusion peptides. *Biochem Soc T* 29:623-626.
14. Flan X, Bushweller JH, Cafiso DS, & Tamm LK (2001) Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin. *Nat Struct Biol* 8(8):715-720.
15. Sakuma T, Fligashiyama S, Flosoe S, Flayashi S, & Taniguchi N (1997) CD9 antigen interacts with heparin-binding EGF-like growth factor through its heparin-binding domain. *Journal of biochemistry* 122(2):474-480.
- 35 16. Fligashiyama S, Abraham JA, & Klagsbrun M (1993) Heparin-Binding EGF-Like Growth-Factor Stimulation of Smooth-Muscle Cell-Migration - Dependence on Interactions with Cell-Surface Heparan-Sulfate. *J Cell Biol* 122(4):933-940.
17. Thompson SA, et al. (1994) Characterization of Sequences within Heparin-Binding EGF-Like Growth-Factor That Mediate Interaction with Heparin. *J Biol Chem* 269(4):2541-2549.
- 40 18. Kaplan IM, Wadia JS, & Dowdy SF (2005) Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis (vol 102, pg 247, 2005). *J Control Release* 107(3):571-572.
19. Lawrence R, Lu H, Rosenberg RD, Esko JD, & Zhang LJ (2008) Disaccharide structure code for the easy representation of constituent oligosaccharides from glycosaminoglycans. *Nat Methods* 5(4):291-292.
20. Lin X, et al. (2000) Disruption of gastrulation and heparan sulfate biosynthesis in EXT1-deficient mice. *Dev Biol* 224(2):299-311.
- 45 21. Dick E, Matsa E, Young LE, Darling D, & Denning C (2011) Faster generation of hiPSCs by coupling high-titer lentivirus and column-based positive selection. *Nat Protoc* 6(6):701-714.
22. Anderson RGW (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67:199-225.
23. Nichols BJ & Lippincott-Schwartz J (2001) Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* 11(10):406-412.
- 50 24. Liu NQ, et al. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Virol* 76(13):6689-6700.
25. West MA, Bretscher MS, & Watts C (1989) Distinct Endocytotic Pathways in Epidermal Growth Factor-Stimulated Human Carcinoma A431 Cells. *J Cell Biol* 109(6):2731-2739.
- 55 26. Sampath P & Pollard TD (1991) Effects of Cytochalasin, Phalloidin, and Ph on the Elongation of Actin-

- Filaments. *Biochemistry-Ur* 30(7):1973-1980.
27. Oliver JM, Berlin RD, & Davis BH (1984) Use of Horseradish-Peroxidase and Fluorescent Dextran to Study Fluid Pinocytosis in Leukocytes. *Method Enzymol* 108:336-347.
28. Araki N, Johnson MT, & Swanson JA (1996) A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of
5 macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol* 135(5):1249-1260.
29. Seglen PO, Grinde B, & Solheim AE (1979) Inhibition of the Lysosomal Pathway of Protein-Degradation in Isolated Rat Hepatocytes by Ammonia, Methylamine, Chloroquine and Leupeptin. *Eur J Biochem* 95(2):215-225.
30. Eustice DC & Wilhelm JM (1984) Mechanisms of Action of Aminoglycoside Antibiotics in Eukaryotic Protein-Synthesis. *Antimicrob Agents Ch* 26(1):53-60.
- 10 31. Yu JY, Chau KF, Vodyanik MA, Jiang JL, & Jiang Y (2011) Efficient Feeder-Free Episomal Reprogramming with Small Molecules. *Plos One* 6(3).
32. Warren L, et al. (2010) Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7(5):618-630.
- 15 33. Kim D, et al. (2009) Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4(6):472-476.
34. Zhou HY, et al. (2009) Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins (vol 4, pg 381, 2009). *Cell Stem Cell* 4(6):581-581.
35. Takahashi K, et al. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5):861-872.
- 20 36. Dixon JE, et al. (2010) Axolotl Nanog activity in mouse embryonic stem cells demonstrates that ground state pluripotency is conserved from urodele amphibians to mammals. *Development* 137(18):2973-2980.
37. Chambers I, et al. (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113(5):643-655.
- 25 38. Robinton DA & Daley GQ (2012) The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 481(7381):295-305.
39. Do Kwon Y, et al. (2005) Cellular manipulation of human embryonic stem cells by TAT-PDX1 protein transduction. *Mol Ther* 12(1):28-32.
40. Hidema S, Tonomura Y, Date S, & Nishimori K (2012) Effects of protein transduction with intact myogenic transcription factors tagged with HIV-1 Tat-PTD (T-PTD) on myogenic differentiation of mouse primary cells. *J Biosci Bioeng* 113(1):5-11.
- 30 41. Liang QL, Mo ZY, Li XF, Wang XX, & Li RM (2013) Pdx1 protein induces human embryonic stem cells into the pancreatic endocrine lineage. *Cell Biol Int* 37(1):2-10.
42. Bichsel C, et al. (2013) Direct Reprogramming of Fibroblasts to Myocytes via Bacterial Injection of MyoD Protein. *Cell Reprogram* 15(2):117-125.
- 35 43. Chan EM, et al. (2009) Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. *Nat Biotechnol* 27(11):1033-U1100.
44. Smith KP, Luong MX, & Stein GS (2009) Pluripotency: Toward a Gold Standard for Human ES and iPS Cells. *J Cell Physiol* 220(1):21-29.
- 40 45. Burrige PW, et al. (2011) A Universal System for Highly Efficient Cardiac Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells That Eliminates Interline Variability. *Plos One* 6(4).
46. Campbell RE, et al. (2002) A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(12):7877-7882.
47. Okamoto T, et al. (2002) Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. *Biochem Bioph Res Co* 295(2):354-361.
- 45 48. Anderson D, et al. (2007) Transgenic enrichment of cardiomyocytes from human embryonic stem cells. *Mol Ther* 15(11):2027-2036.
49. Claycomb WC, et al. (1998) HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(6):2979-2984.
- 50 50. Dixon JE, Dick E, Rajamohan D, Shakesheff KM, & Denning C (2011) Directed differentiation of human embryonic stem cells to interrogate the cardiac gene regulatory network. *Mol Ther* 19(9):1695-1703.
51. Medina D, Moskowitz N, Khan S, Christopher S, & Germino J (2000) Rapid purification of protein complexes from mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 28(12).
- 55 52. Novak A, Guo CY, Yang WY, Nagy A, & Lobe CG (2000) Z/EG, a double reporter mouse line that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated excision. *Genesis* 28(3-4):147-155.
53. Bayoussef Z, Dixon JE, Stolnik S, & Shakesheff KM (2012) Aggregation promotes cell viability, proliferation, and differentiation in an *in vitro* model of injection cell therapy. *J Tissue Eng Regen M* 6(10):e61-e73.
- 60 **Mejora de la eficiencia de la captación de nanopartículas de óxido de hierro mediante el uso de péptidos de penetración celular**

Antecedentes

- 65 Las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONS) son pequeñas partículas altamente magnetizadas que consisten en un núcleo de óxido de hierro y un revestimiento de superficie. Las SPIONS se han

aprobado clínicamente para su uso en agentes de contraste de IRM¹, y actualmente se están investigando para su uso en la administración de fármacos dirigida², el tratamiento de la hipertermia y el etiquetado celular³. Las SPIONS se han aprobado para su uso en agentes de contraste para IRM y los productos disponibles comercialmente incluyen Lumiren, Resivist y Feridex.¹

Las aplicaciones de SPIONS requieren una concentración adecuada que se internalice en las células y, sin el direccionamiento requerido de las nanopartículas, puede conducir a un resultado ineficiente. La eficiencia de la internalización celular puede depender del tamaño, el recubrimiento y los ligandos adicionales, para nombrar algunos⁴. La bibliografía muestra que sin la unión de los agentes de internalización, los investigadores están logrando un rango de 15-30 pg de hierro por célula^{5,6}. Los grupos funcionales en los recubrimientos de nanopartículas se pueden aprovechar para dirigirse a la internalización celular fijando los anticuerpos monoclonales, los péptidos de penetración celular y las moléculas pequeñas como agentes de internalización.⁷

Un péptido de penetración celular investigado actualmente es Arg-Gly-Asp (RGD). RGD se diseñó para dirigirse a la $\alpha v \beta 3$ integrina⁸. La integrina se puede encontrar predominantemente en células cancerosas, por lo que también se puede usar como un péptido de direccionamiento. La investigación encontró que el péptido RGD aumentó la captación de nanopartículas en un 50 %.⁹

El siguiente estudio se centra en un péptido de penetración celular de la invención en el presente documento, en particular P218R. El péptido tiene dos dominios, P21 se une al sulfato de heparán (HS) en la membrana celular y el 8R ayuda en la transducción. El objetivo del estudio fue identificar la eficiencia del P218R e investigar su mecanismo.

Materiales y métodos

Etiquetado de nanopartículas

Se añadió EDAC 31 mM con NHS 0,1 M disuelto en tampón MES 0,5 M a partículas de Nanomag-D (250 nm) en una relación de 1:5 respectivamente y se mezcló durante 1 hora. Las partículas se lavan entonces en un tampón MES 0,1 M y se añaden 0,2 µg/µl del agente de etiquetado requerido disuelto en el mismo tampón para obtener una relación 1:1 de solución de etiquetado y nanopartículas, y se mantuvo una alícuota de la solución de etiquetado para ensayar la eficiencia de etiquetado. Después, la solución se mezcla continuamente a temperatura ambiente durante 3 horas. Una vez que las partículas están etiquetadas, se añade una solución de glicina 25 mM a las partículas y después se incuban durante 30 minutos. Se conserva una alícuota de la solución de etiquetado para compararla con la alícuota anterior y las partículas se lavan en BSA al 0,1 % en PBS. Las partículas finalmente se diluyen en BSA al 0,1 % en PBS para dar una solución de 1 mg/ml. Tanto las alícuotas de la solución de etiquetado como algunas de las nanopartículas etiquetadas se evaluaron para determinar la fluorescencia.

Cultivo celular

Las células de fibroblasto NIH 3t3 se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco), complementado con suero fetal bovino (FCS, Sigma) al 10 % (v/v), L-glutamina 2 mM y (PS) a 37 °C y CO₂ al 5 %. Las células se cultivaron entonces hasta su confluencia.

Etiquetado celular

Las células confluentes se dividieron en placas de 12 pocillos a 200.000 células/pocillo y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Después de 24 horas, se añadieron 50 µg de nanopartículas de óxido de hierro Nanomag-D (250 nm) y se añadieron 0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 2, 1, 5 y 10 µM de péptido de penetración celular a las células con DMEM en FCS al 10 % o medio DMEM sin suero y se dejaron durante 24 horas para que las nanopartículas de hierro se internalicen. Después de la incubación, las células se lavaron en PBS para eliminar el exceso de nanopartículas y después se recolectaron para obtener una tinción cualitativa con azul de Prusia, un ensayo cuantitativo de hierro colorimétrico o una citometría de flujo activada por fluorescencia.

Tinción de azul de Prusia

Las células se marcaron y después se fijaron en PFA al 4 % (p/v) durante 15-20 minutos a 4 °C. Se añadió una solución al 2,5 % de tinción de ferrocianuro de potasio en HCl al 2,5 % a las células y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Si las nanopartículas estaban presentes, apareció una mancha azul que es proporcional a la concentración de hierro.

Ensayo de hierro colorimétrico cuantitativo Las células se marcaron, se tripsinizaron y se sedimentaron y, después, se eliminó todo el medio. Se añadieron 40 µl de HCl al 37 % a las células y se calentaron a 70 °C hasta que se disolvieron, después se neutralizaron con 50 µl de NaOH. Las muestras que contenían una alta concentración de hierro se diluyeron 1:10, después se añadieron 40 µl de reactivo de trabajo Quantichrom y se siguieron las instrucciones en el ensayo de hierro Quantichrom.

Citometría de flujo

Las células se marcaron con 50 µg de partículas de Nanomag-D, P218R 1 µM y 0, 0,1, 1 y 5 µg/ml de FitC-BSA. Después, las células se fijaron y se ejecutaron a través de un citómetro de flujo Coulter Altra para evaluar la fluorescencia verde. Los hallazgos se analizaron estadísticamente por el software de Wesal.

Resultados

Etiquetado de nanopartículas y células

Las partículas Nanomag-D (250 nm) se marcaron con éxito con mR, P21mR, 8RmR y P21mR8R como se muestra en la Figura 32. Los gráficos muestran claramente una reducción en la fluorescencia en la solución post-etiquetado y un aumento de la fluorescencia en las partículas, lo que sugiere que la proteína ha reaccionado con un grupo de ácido carboxílico y se ha unido a la superficie de las partículas de Nanomag. Los gráficos muestran que no todas las proteínas han reaccionado con la superficie de la partícula, pero considerando que las proteínas se añadieron en exceso, esto no se consideró un problema. Otra característica de los gráficos es que el dominio P21 comparado con el 8R tiene una mayor afinidad por la unión a las partículas, ya que hay una reducción más distintiva en el etiquetado posterior de la fluorescencia y una señal más intensa presentada por las nanopartículas para el P21. Considerando que la proteína se añadió en exceso de la capacidad de unión de las partículas, tal reducción fue inesperada. La función del dominio P21 es que se une a HS en la membrana de una célula, también se podría concluir que la proteína se une a la superficie de dextrano de las partículas considerando las estructuras similares de las dos sustancias.

Para probar adicionalmente la hipótesis de la unión de P21 a la superficie de dextrano, ambas partículas que han sido previamente marcadas con P21mR8R se añadieron a las células y las partículas y P218R se añadieron por separado a las células. Los resultados de la tinción con azul de Prusia se muestran en la Figura 32. Para el control de partículas no marcadas, no se observó ninguna tinción azul, por lo que se concluye que un número limitado de partículas debe haberse asociado con las células. Sin embargo, para ambas variables, la mancha había reaccionado produciendo un color azul incluso cuando la proteína no estaba previamente unida. La proteína debe haberse unido a la partícula en algún momento para que se produzca la captación de partículas. La hipótesis más probable es que el P21 se une a la superficie de dextrano.

Evaluación cuantitativa de la absorción de nanopartículas

Optimización de la concentración de proteínas

Como se muestra en la Figura 33, la tinción con azul de Prusia prueba que el P218R es el péptido más eficaz para la captación de partículas en comparación con P21 y 8R en solitario. Los resultados del ensayo de hierro mostraron que, cuando las células se incuban durante 24 horas con 1 µM de P218R y 50 µg de partículas de Nanomag-D, el 100 % de las partículas se asocia con las células y 63 pg/célula. Por lo tanto, se concluyó que solo se necesita 1 µM de P218R para una captación del 100 % de las partículas.

Evaluación del tiempo necesario para la asociación celular de nanopartículas

Todos los resultados indicaron que la asociación celular de nanopartículas óptima es a las 24 horas, como se muestra en la Figura 34. Como en el punto de tiempo de 24 horas, el 100 % de las partículas están asociadas con las células; esto también encaja con los resultados que se muestran en la Figura 33. El gráfico también es una clara evidencia del aumento drástico en la captación de partículas con el péptido añadido, a partir de esta información, el porcentaje de captación aumenta del 7 % sin el péptido añadido hasta el 96 % con el péptido añadido después de 24 horas.

Efecto del medio sin suero

Los resultados en la Figura 35 muestran una disminución del 30 % en la captación a medida que el porcentaje de suero aumenta al 20 %. Esta disminución se reduce a solo el 16 % cuando se añade P218R 1 µM. Esta disminución en la absorción a medida que aumenta la cantidad de suero se ha atribuido a la disminución de la endocitosis, ya que las condiciones sin suero inducen la endocitosis debido a la disminución de nutrientes. Si la disminución de la endocitosis se reduce cuando se añade el péptido, entonces se podría suponer que aumenta la endocitosis. Se encontró que la adición del péptido aumentaba la endocitosis a medida que aumentaba la cantidad de FitC-BSA absorbida por las células, mientras que las nanopartículas no afectaban a la captación, estos resultados se muestran en la Figura 35. El aumento en la captación de FitC-BSA podría correlacionarse con un aumento en la endocitosis que conduce a un aumento en la captación de partículas. Hay una diferencia menos distintiva cuando las células están en condiciones sin suero ya que el suero libre en solitario aumenta la endocitosis.

Factores de competición para la unión de P21

Se ha comprobado que el P21 se une a HS en las membranas celulares, por lo tanto, se puede suponer que si se añade heparina al medio, esto inhibirá competitivamente la unión y, por lo tanto, la captación de nanopartículas. Los resultados se muestran en la Figura 35. El gráfico demuestra que la heparina es un inhibidor de la unión y el grado de inhibición demuestra que P21 tiene una afinidad más alta por la heparina que HS en la membrana celular y, por lo tanto, demuestra que la unión de P21 es esencial para el mecanismo de captación de las nanopartículas. P21 también puede unirse al dextrano en la superficie de las nanopartículas, por lo que se añadieron concentraciones crecientes de dextrano al medio. Los resultados se muestran en la Figura 35. Existe una disminución en la captación de nanopartículas del 18 % a medida que aumenta la concentración de dextrano. El dextrano actuará como un inhibidor competitivo para la unión de partículas y, debido a la reducción limitada de la inhibición, P21 tiene una mayor afinidad por la membrana celular.

Discusión

Los resultados muestran que la adición de una pequeña cantidad de P218R conduce a una captación del 100 % de las nanopartículas de óxido de hierro. La microscopía y la tripsinización de las células indican que las partículas se están internalizando. Los experimentos también se realizaron utilizando células madre mesenquimales que muestran una asociación del 90 % de partículas. El mecanismo detrás de la captación depende de la acción simbiótica de los dos dominios del péptido. La hipótesis es que P21 se puede unir tanto a HS en la membrana celular como al dextrano en el recubrimiento de las nanopartículas, el péptido tiene múltiples puntos de unión por los que tanto la nanopartícula como la célula pueden unirse a la misma P21. Por lo tanto, la proteína previamente unida a la partícula también puede unirse a la membrana manteniendo la partícula cerca de la célula. El 8R puede entonces ayudar en la transducción de la nanopartícula por endocitosis. O el otro mecanismo podría involucrar la unión previa del péptido a la nanopartícula y después, cuando se encuentra cerca de una membrana celular, HS tiene una mayor eficiencia de unión, por lo que el P21 se une a la célula. Esto puede conducir entonces a que la partícula se internalice. Las ventajas de usar el péptido P218R es su eficiencia en medio sérico que puede estar más relacionada con el entorno *in vivo* y que el sistema no requiere el uso del grupo funcional en el recubrimiento de superficie de las nanopartículas. El grupo funcional libre significa que las moléculas o fármacos dirigidos pueden unirse covalentemente a la partícula.

Conclusión

Se ha encontrado que el péptido P218R causa el 100 % de asociación celular de nanopartículas. Se ha encontrado que esto se debe a un mecanismo de unión a dextrano que puede utilizarse para muchas aplicaciones, por ejemplo, para el direccionamiento de nanopartículas para tejidos específicos mediante la unión de anticuerpos o la administración de fármacos.

Referencias

1. Singh, A & Sahoo, S, (2013), Magnetic Nanoparticles: a novel platform for theranostics, Drug Disc Today,
2. Arruebo, M et al, (2007) Magnetic Nanoparticles for drug delivery, Nanotoday, 3, 22
3. Wang, Z and Cuschieri A, (2013) Tumor cell labelling by magnetic nanoparticles with determination of intracellular iron content and spatial distribution of the intracellular iron, Int. J. Mol. Sci, 14, 9111
4. Sun, C, Lee, J and Zhang, M, (2008), Magnetic Nanoparticles in MR Imaging and drug delivery, Adv Drug Deli Rev, 60, 1253
5. Schlorf, T et al, (2011), Biological properties of iron oxide nanoparticles for cellular and molecular magnetic resonance imaging, Int. J. Mol. Sci. 12, 12
6. Markides, H et al, (2013) Whole body tracking of superparamagnetic iron oxide nanoparticle labelled cells - a rheumatoid arthritis mouse model, Stem cell Res & ther, 4, 126
7. Peng et al, (2008), targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumour imaging and therapy, Int. J. of Nanomed. 3, 311
8. Zhang, C et al, (2007), Specific Targeting of Tumor Angiogenesis by RGD-Conjugated Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Particles Using a Clinical 1.5-T Magnetic Resonance Scanner, Can. Res. 67, 1555
9. Ji, S et al, (2012), RGD-conjugated albumin nanoparticles as a novel delivery vehicle in pancreatic cancer therapy, Cancer Biology & Therapy 13:4, 206.

CPP modificados para una administración de tipo celular eficiente de moléculas terapéuticas a través de GET (transducción mejorada de unión a glucosaminoglicano (GAG))

Introducción

El primer objetivo de este estudio fue investigar si el aumento sinérgico mediado por GET en la administración de mRFP en células con P21 8R se pudo observar cuando P21 se reemplazó por dominios de unión a HS-GAG derivados de factor de crecimiento. El segundo objetivo de este estudio fue mostrar la administración específica del tipo celular en una población heterogénea de células mediante el direccionamiento a un epítipo HS de la superficie

celular específico. Merry et al han demostrado la utilidad de un anticuerpo de unión al epítipo HS en el direccionamiento a una subpoblación de células durante la diferenciación mesodérmica [13]. La región variable de este anticuerpo se conjugó con 8R para mostrar un ejemplo de la administración específica del tipo celular. El tercer objetivo de este estudio fue demostrar la administración mediada por GET de biomoléculas terapéuticas. La transfección del gen indicador (pSIN GFP) se optimizó con el péptido P21 LK15 8R y se comparó con un reactivo de transfección basado en lípidos comercial "estándar" Lipofectamine2000.

Administración específica del tipo celular a través de GET *Procedimientos experimentales*

10 Preparación de péptidos

Los péptidos, mRFP, mRFP 8R, P21 mRFP 8R, FGF1A mRFP, FGF1A mRFP 8R, FGF2A mRFP, FGF2A mRFP 8R, FGF4A mRFP, FGF4A mRFP 8R, FGF7A mRFP, FGF7A mRFP 8R, FGF1B mRFP, FGF1B mRFP 8R, FGF2B mRFP, FGF2B mRFP 8R, FGF4B mRFP, FGF4B mRFP 8R, FGF7B mRFP, FGF7B mRFP 8R, FGF1C mRFP, FGF1C mRFP 8R, FGF2C mRFP, FGF2C mRFP 8R, FGF4C mRFP, FGF4C mRFP 8R, FGF7C mRFP, FGF7C mRFP 8R, ATIII mRFP, ATIII mRFP 8R, PDGF mRFP, PDGF mRFP 8R, VEGF mRFP, VEGF mRFP 8R, HS4C3 mRFP y HS4C3 mRFP 8R, se clonaron como ADNc en el vector pGEX6-PI (Novagen), se expresaron en BF21 (DE21) pFysS *Escherichia coli* (Novagen) y se purificaron como se describe previamente [12]. La integridad y la expresión del péptido de longitud completa se confirmaron mediante SDS-PAGE. La fluorescencia de los péptidos recombinantes se confirmó utilizando el lector multimodo TECP infinite 200PRO, la diferencia en las mediciones de intensidad de fluorescencia entre muestras fue <10 %.

Ensayo de péptidos

Se utilizó el ensayo de Bradford para cuantificar la concentración de proteínas [14]. La absorbancia se midió a 595 nm utilizando la proteína mRFP recombinante como patrón [12]. Las muestras se analizaron utilizando el lector multimodo TECAN infinite 200PRO.

Cultivo celular de células NIH3T3, CGR-8 y HUES7

Las células NIH3T3, CGR-8 y HUES7 se cultivaron y se mantuvieron como se describe anteriormente [12]. Las células de fibroblastos de ratón NIH3T3 se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con suero fetal bovino (FCS) al 10 % (v/v) complementado con L-glutamina 2 mM y 100 µg/ml de estreptomocina. Las células madre embrionarias de ratón CGR-8 se mantuvieron en DMEM con FCS al 20 % (v/v) complementado con 1000 unidades/ml de factor inhibidor de leucemia (LIF), β-mecaptoetanol 100 µM, F-glutamina 2 mM y 100 µg/ml de estreptomocina. Las células madre embrionarias humanas HUES7 se cultivaron en un matraz de cultivo de tejidos recubierto de gelatina. Las células se mantuvieron en DMEM con FCS al 20 % (v/v) complementado con 1000 unidades/ml de LIF, β-mecaptoetanol 100 µM, L-glutamina 2 mM y 100 µg/ml de estreptomocina. Todas las células se incubaron a 37 °C en condiciones humidificadas con CO₂ al 5 %.

Administración de péptidos a las células

Las células se sembraron en 2×10^5 células/pocillo en placas de 12 pocillos y se incubaron durante 2 h en 1 ml de medio de crecimiento relevante (GM) a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5%. El péptido se diluyó a 20 µg/ml en 500 µl de GM. Cada pocillo de células se aspiró, se lavó con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se reemplazó con 500 µl de solución de péptido. Las células se incubaron con el péptido a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 % durante 20 h. Después de la incubación, cada pocillo de células se lavó con PBS, se tripsinizó y se fijó con el 3,7 % de paraformaldehído (PFA) en preparación para la citometría de flujo. Cada experimento se realizó por duplicado y se repitió 3 veces, n = 3.

Mantenimiento y diferenciación de las células Bry-GFP ES, Generación de EB

La línea de células madre embrionarias murinas Bry-GFP se mantuvo y se diferenció como se describe anteriormente [13]. Las células Bry-GFP se mantuvieron en alimentadores en DMEM-ES (DMEM con FCS al 15 % complementado con $1,5 \times 10^5$ M de monioglicerol (MTG), 10 ng/ml de LIF y L-glutamina 2 mM).

Las células Bry-GFP se diferenciaron como EB. Antes de la diferenciación, las células se pasaron dos veces, primero en un matraz recubierto de gelatina en DMEM-ES y segundo en un matraz en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM)-ES (IMDM con FCS al 15 % complementado con monioglicerol $1,5 \times 10^4$ M de monioglicerol (MTG), 10 ng/ml de LIF y L-glutamina 2 mM). Después, las células se diferenciaron como EB durante 2,8 días en IMDM con FCS al 15 % complementado con 4×10^4 M de MTG, 300 µg/ml de transferrina, 25 µg/ml de ácido ascórbico y L-glutamina 2 mM en placas de grado Petri. 3 h antes de la disociación, los EB se trataron con 50 µg/ml de HS4C3 mRFP o HS4C3 mRFP 8R. Después de la diferenciación, los EB se separaron en células individuales mediante incubación y agitación durante 10 minutos en un tampón de disociación celular y se fijaron en PFA.

Análisis de citometría de flujo

Las células se analizaron en un citómetro de flujo MoFlo™ DP (DAKO) utilizando un láser verde a 488 nm y/o un láser rojo a 633 nm. (40.000 células; activadas en células vivas por dispersión directa/lateral). La fluorescencia media se utilizó para los análisis estadísticos.

Resultados y análisis

CPP modificados para incluir GET

En este estudio, los dominios de unión a HS-GAG del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)-1, FGF-2, FGF-4, FGF-7, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y antitrombina III (ATIII) se acoplaron a 8R. Estos factores de crecimiento desempeñan importantes funciones biológicas en el desarrollo embrionario y la angiogénesis. También se ha demostrado que interactúan con HS-GAG de la superficie celular, de manera similar a P21. Los fibroblastos murinos NIH 3T3, las células madre embrionarias murinas CGR8 y las células madre embrionarias humanas HUES-7 se trataron con estas CPP modificados para investigar si alguno de los péptidos demostró un aumento mediado por GET en la administración de mRFP (Figura 37). También fue importante explorar si alguno de los péptidos modificados se dirigiría preferiblemente a los epítomos HS que se expresaban más abundantemente en cualquiera de los diferentes tipos de células.

Se ha identificado un panel de cuatro CPP modificados que mostraban una transducción mejorada mediada por GET en las células. P21 8R, FGF2B 8R, FGF7B 8R y PDGF 8R han demostrado un aumento de 30-100 veces en la transducción de mRFP en células sobre el uso de solo 8R (Figura 38 y 39). P21 8R, FGF7B 8R y PDGF 8R mostraron una transducción preferencial en células madre embrionarias HUES-7. Esto demuestra la transducción preferencial de CPP en un tipo de célula que se considera difícil de transducir. FGF2B 8R mostró transducción específica de pluripotencia en células madre embrionarias CGR8 y HUES7. Los diversos perfiles de administración de los CPP modificados en los tres tipos de células sugieren que los dominios de unión a HS-GAG de diferentes factores de crecimiento se dirigen y se unen a diferentes epítomos HS de la superficie celular. El direccionamiento de los epítomos HS que se expresan más abundantemente por tipos de células específicos puede utilizarse para la sección de CPP que son más adecuados para su aplicación.

Administración mediada por GET de ADN plasmídico

Procedimientos generales

Preparación de péptidos

El péptido P21-LK15-8R se sintetizó utilizando la química t-Boc en fase sólida (Novabiochem (Beeston, Nottinghamshire, RU)).

Cultivo celular

Las células de fibroblastos de ratón NIH3T3 se mantuvieron en DMEM con medio de suero fetal bovino (FCS) al 10% (v/v) complementado con L-glutamina 2 mM y 100 ug/ml de estreptomocina. Las células se incubaron a 37 °C en condiciones humidificadas con CO₂ al 5 %.

Preparación de ADN plasmídico

El ADN (pSIN GFP) se amplificó en E. coli. El ADN se extrajo y se purificó utilizando un kit QIAGEN Plasmid Maxi (Qiagen). El ADN se precipitó en etanol al 100 % y se rehidrató en dH₂O. La pureza del plásmido se confirmó utilizando el nanodrop.

Ensayo de complejación péptido-ADN

Se diluyeron 10 ug de ADN en 60 ul de solución salina tamponada con ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES) (HEPES 10 mM, solución 150 mM de cloruro sódico (NaCl), pH 7,4). La solución madre 1 mM de YO-PRO-1 se diluyó hasta 0,1 mM en dimetilsulfóxido (DMSO). Se prepararon 2,7 ul de la solución diluida de YO-PRO-1 hasta 60 ul en solución salina tamponada con HEPES y se añadieron gota a gota al ADN diluido. La solución de ADN/YO-PRO-1 se mezcló, se envolvió en papel de aluminio y se incubó durante 5 h a temperatura ambiente. Después de 5 h, la solución de ADN/YO-PRO-1 se constituyó hasta 1 ml en solución salina tamponada con HEPES y añadieron por pipeteo 100 ul de alícuotas en tubos de eppendorf por condición de tratamiento. Las cantidades de péptidos correspondientes a las relaciones de carga deseadas (+/-) se añadieron a cada eppendorf (Apéndice 1). Las soluciones de péptido/ADN/YO-PRO-1 se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las mediciones de fluorescencia se analizaron entonces utilizando el lector multimodo TECPI infinite 200PRO. De forma similar, se realizó un control sin ADN mediante la dilución de 2,7 ul de la solución de YO-PRO-1 diluida en 120 ul de solución salina tamponada con HEPES y siguiendo el procedimiento anterior.

Diseño y optimización del experimento de transfección

Las células se sembraron a 80.000 células por pocillo en placas de 12 pocillos y se incubaron durante una noche en 1 ml de GM al 10 % a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 %. Para cada pocillo de células a transfectar, el ADN se diluyó en 100 ul de Opti-MEM® y se mezcló. El péptido se añadió directamente al ADN diluido en la relación de carga óptima (+/-). Después, la solución se mezcló y se incubó durante 25 min a temperatura ambiente. Las células se aspiraron, se lavaron con PBS y se reemplazaron con 400 ul de Opti-MEM®. Cada pocillo de células se trató con 100 ul de complejo de péptido/ADN y se incubó a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. El apéndice 2 muestra las diferentes condiciones de tratamiento utilizadas para cada pocillo. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se reemplazaron con 1 ml de GM. Después de 48 h, cada pocillo de células se lavó con PBS, se tripsinizó y se fijó con PFA al 3,7 %. Los experimentos se repitieron 3 veces.

La optimización de la transfección con Lipofectamine2000 se realizó como se describe en la guía del fabricante (Invitrogen). Las células se sembraron a 80.000 células por pocillo en placas de 12 pocillos y se incubaron durante una noche en 1 ml de GM a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 %. Para cada pocillo de células a transfectar, el ADN se diluyó en 100 ul de Opti-MEM® y se mezcló. Se añadieron 1,5 ul de Lipofectamine2000 directamente al ADN diluido. Después, la mezcla se mezcló y se incubó durante 25 min a temperatura ambiente. Las células se aspiraron, se lavaron con PBS y se reemplazaron con 400 ul de Opti-MEM®. Cada pocillo de células se trató con 100 ul de complejo Lipofectamine2000/ADN y se incubó a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. Después de 6 h, las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se fijaron con PFA al 3,7 %. Esto se repitió con volúmenes variables de Lipofectamine2000 (3 ul y 4,5 ul) para encontrar la relación óptima de Lipofectamine2000 con respecto al ADN. Los experimentos se repitieron 3 veces.

Análisis de citometría de flujo

Las células se analizaron en un citómetro de flujo MoFlo™ DP (DAKO) utilizando un láser rojo a 633 nm. (40.000 células; activadas en células vivas por dispersión directa/lateral). La fluorescencia media se utilizó para los análisis estadísticos.

Resultados y análisis

Péptido para la unión a ADN

El ensayo YO-PRO-1 se puede usar para investigar la capacidad de condensación del ADN de un péptido de unión al ADN. YO-PRO-1 es un colorante de cianina que se une al ADN para formar un complejo de ADN/tinte fluorescente. Se pueden añadir diferentes relaciones de carga (+/-) de péptido al complejo de ADN/tinte fluorescente. Cuando el péptido compete con el tinte uniéndose al ADN, se observa una reducción en la intensidad de la fluorescencia. En este estudio, LK15 se fusionó con la proteína de transducción P21 8R para mejorar la capacidad de unión al ADN del péptido de penetración celular modificado. Se ha demostrado que la fusión del péptido LK15 a TAT mejora significativamente la transfección de pDNA en células cultivadas con HT29 y HT1080 [19]. Se cree que la eficiencia de transducción mejorada de Tat-LK15 sobre Tat se debe a la capacidad mejorada de condensación del péptido y el ADN, y una mejor transducción del ADN a través de la membrana celular [20].

Se representó un gráfico de la relación de carga (+/-) frente al % de fluorescencia para investigar la relación óptima de P21 LK15 8R con respecto a pSIN GFP (Figura 40). Los resultados mostraron que la relación de carga óptima (+/-) de P21 LK15 8R con respecto a pSIN GFP fue 2:1, respectivamente. Esta relación se utilizó en los experimentos de transfección.

Transfección del gen indicador de pDNA a través de P21 LK15 8R

La bicapa de fosfolípidos de la membrana celular actúa como una barrera impenetrable para los ácidos nucleicos y, por lo tanto, el pDNA se conjugará con un CPP modificada para facilitar su transporte a la célula [2]. En este estudio, la transfección mediada por GET del gen indicador pSIN GFP en células fibroblásticas murinas NIH 3T3 se optimizó en términos de tiempo de transfección (3, 6 o 24 h), medio de transfección (con o sin suero) y cantidad de ADN (1, 4 o 10 ug). El gen indicador pSIN GFP se transfectó en células utilizando P21 LK15 8R donde P21 se dirige y se une a los HS-GAG de la superficie celular, los complejos LK15 pSIN GFP y 8R transducen pSIN GFP a través de la membrana celular. La eficiencia de transfección de pSIN GFP con P21 LK15 8R se comparó con la eficiencia de transfección del reactivo de transfección a base de lípidos usado comercialmente lipofectamine2000. Las células se fijaron a las 48 h después de la transfección para permitir que se capturara la expresión transitoria de GFP y se cuantificaron las eficiencias de transfección mediante citometría de flujo (Figura 41).

Los sistemas portadores de genes deben ser resistentes al suero para aplicaciones in vivo eficaces, sin embargo, la mayoría de los portadores de genes, incluyendo lipofectamine2000, han demostrado grandes reducciones en la eficiencia de transfección en medios que contienen suero [21]. Se cree que esto se debe a que las moléculas de suero se unen competitivamente al portador de genes, disminuyendo así los portadores de genes libres disponibles para la unión al ADN [22]. La eficiencia de transfección de P21 LK15 8R se caracterizó en medio de transfección con

suero y medio de transfección libre de suero. Las condiciones de transfección óptimas fueron cuando las células se transfectaron con 10 ug de ADN durante 24 h en condiciones de suero en las que la eficacia de la transfección alcanzó $17,9 \pm 4,8 \%$. (Figura 42). Esto es 3 veces más bajo que la eficiencia de transfección optimizada observada para lipofectamine2000 en condiciones sin suero ($54,7 \pm 10,3 \%$, Apéndice 3); sin embargo, la resistencia al suero de la transfección con P21 LK15 8R es ventajosa para cualquier tipo de administración clínica/in vivo de biomoléculas terapéuticas. Además, está bien documentado que las estrategias de escape endosómico aumentan en gran medida las eficiencias de las transfecciones mediadas por CPP.

Conclusiones

Un panel de CPP que se han modificado para incluir dominios de unión a HS-GAG de la superficie celular derivados del factor de crecimiento ha mostrado un aumento de 30-100 veces en la transducción en las células, en comparación con los CPP no modificados. La hipótesis es que la administración mediada por GET de estos péptidos se debe a la doble funcionalidad del péptido en i) el aumento de la interacción con la membrana celular a través del dominio de unión a HS-GAG, y ii) la transducción de proteínas a través de la membrana celular a través de 8R. Los CPP modificados mostraron perfiles de administración preferenciales de mRFP en diferentes tipos de células, esto se debe a los dominios de unión a HS-GAG que se dirigen a epítomos HS específicos que se expresan más abundantemente en diferentes tipos de células. El trabajo futuro es modificar los CPP para incluir dominios de unión a epítomo HS derivados de anticuerpos específicos. Se pueden utilizar bibliotecas de unión a epítomo HS de anticuerpos para la administración específica del tipo celular de moléculas terapéuticas a través de GET.

Para demostrar la utilidad de estos péptidos para la administración de moléculas terapéuticas, se usó P21 FK15 8R para administrar el gen indicador pSIN GFP en las células. Los resultados mostraron eficiencias de transfección mediada por GET de hasta el $17,9 \pm 4,8 \%$ en condiciones de suero, sin ninguna estrategia de escape endosómico. Los CPP modificados para incluir dominios de unión a HS-GAG muestran una gran promesa como alternativas al uso de vehículos de administración a base de lípidos y virus para la administración in vivo de biomoléculas terapéuticas.

Referencias

- [1] Bechara C, Sagan S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *Febs Letters* 2013;587:1693-702.
- [2] Tanaka K, Kanazawa T, Ogawa T, Suda Y, Takashima Y, Fukuda T, et al. A Novel, Bio-Reducible Gene Vector Containing Arginine and Histidine Enhances Gene Transfection and Expression of Plasmid DNA. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2011;59:202-7.
- [3] Mitchell DJ, Kim DT, Steinman L, Fathman CG, Rothbard JB. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *Journal of Peptide Research* 2000;56:318-25.
- [4] Nakase I, Niwa M, Takeuchi T, Sonomura K, Kawabata N, Koike Y, et al. Cellular uptake of arginine-rich peptides: Roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Molecular Therapy* 2004;10:1011-22.
- [5] Ma DX, Shi NQ, Qi XR. Distinct transduction modes of arginine-rich cell-penetrating peptides for cargo delivery into tumor cells. *International Journal of Pharmaceutics* 2011;419:200-8.
- [6] El-Sayed A, Futaki S, Harashima H. Delivery of Macromolecules Using Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides: Ways to Overcome Endosomal Entrapment. *Aaps Journal* 2009;11:13-22.
- [7] Shiraishi T, Nielsen PE. Enhanced delivery of cell-penetrating peptide-peptide nucleic acid conjugates by endosomal disruption. *Nature Protocols* 2006;1:633-6.
- [8] Matsubara Y, Chiba T, Kashimada K, Morio T, Takada S, Mizutani S, et al. Transcription activator-like effector nuclease-mediated transduction of exogenous gene into IL2RG locus. *Scientific Reports* 2014;4.
- [9] Parelkar SS, Letteri R, Chan-Seng D, Zolochovska O, Ellis J, Figueiredo M, et al. Polymer-Peptide Delivery Platforms: Effect of Oligopeptide Orientation on Polymer-Based DNA Delivery. *Biomacromolecules* 2014;15:1328-36.
- [10] Yang HY, Vonk LA, Licht R, van Bortel AMG, Bekkers JEJ, Kragten AHM, et al. Cell type and transfection reagent-dependent effects on viability, cell content, cell cycle and inflammation of RNAi in human primary mesenchymal cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2014;53:35-44.
- [11] Ma Y, Gong C, Ma YL, Fan FK, Luo MJ, Yang F, et al. Direct cytosolic delivery of cargoes *in vivo* by a chimera consisting of D- and L-arginine residues. *Journal of Controlled Release* 2012;162:286-94.
- [12] James E. Dixon GM, Nina Lane, Chris Denning and Kevin M. Shakesheff Highly Efficient Delivery of Functional Proteins by the Synergistic Effect of GAG Binding Motifs and Cell-Penetrating Peptides. Unpublished 2014.
- [13] Baldwin RJ, ten Dam GB, van Kuppevelt TH, Lacaud G, Gallagher JT, Kouskoff V, et al. A Developmentally Regulated Heparan Sulfate Epitope Defines a Subpopulation with Increased Blood Potential During Mesodermal Differentiation. *Stem Cells* 2008;26:3108-18.
- [14] Bradford MM. RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING PRINCIPLE OF PROTEINDYE BINDING. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248-54.
- [15] Schamhart DHJ, Kurth KH. Role of proteoglycans in cell adhesion of prostate cancer cells: From review to experiment. *Urological Research* 1997;25:S89-S96.
- [16] Delehedde M, Deudon E, Boilly B, Hondemarck H. Proteoglycans in breast cancer. *Pathologie Biologie* 1997;45:305-11.
- [17] Shao C, Shi XF, Phillips JJ, Zaia J. Mass Spectral Profiling of Glycosaminoglycans from Histological Tissue

Surfaces. Analytical Chemistry 2013;85:10984-91.

[18] Thompson KE, Bashor CJ, Lim WA, Keating AE. SYNZIP Protein Interaction Toolbox: *in Vitro* and *in Vivo* Specifications of Heterospecific Coiled-Coil Interaction Domains. *Acs Synthetic Biology* 2012;1:118-29.

[19] Saleh AF, Aojula H, Arthanari Y, Offerman S, Alkotaji M, Pluen A. Improved Tat-mediated plasmid DNA transfer by fusion to LK15 peptide. *Journal of Controlled Release* 2010;143:233-42.

[20] Dufourcq J, Neri W, Henry-Toulme N. Molecular assembling of DNA with amphipathic peptides. *Febs Letters* 1998;421:7-11.

[21] Zhang X, Hu HM, Liu TB, Yang YY, Peng YF, Cai QQ, et al. Multi-armed poly(L-glutamic acid)-graft-polypropyleneimine as effective and serum resistant gene delivery vectors. *International Journal of Pharmaceutics* 2014;465:444-54.

[22] Wu HM, Pan SR, Chen MW, Wu Y, Wang C, Wen YT, et al. A serum-resistant polyamidoamine-based polypeptide dendrimer for gene transfection. *Biomaterials* 2011;32:1619-34.

Apéndice 1. Tabla que muestra cantidades de P21 LK15 8R añadido al terminal de pSIN GFP en diferentes relaciones de carga (+/-)

Relación de carga (+/-) de péptido/ADN	Concentración de péptido (uM)	Volumen de péptido (ul)
1:5	0,49	0,05
1:3	0,82	0,07
1:2	1,23	0,12
1:1	2,47	0,24
2:1	4,94	0,49
3:1	7,41	0,74
5:1	12,35	1,23
10:1	24,7	2,46

Apéndice 2. Tabla que muestra las diferentes condiciones de tratamiento para la optimización de la transfección de pSIN GFP en células NIH 3T3 por P21 LK15 8R.

Pocillo	Cantidad de ADN (ug)	Medio de transfección (Optimem, OptiMEM + Suero al 10 %)	Tiempo de transfección (h)
1	1	Opti-MEM®	3 h
2	1	Opti-MEM® al 10 % + suero	3 h
3	1	Opti-MEM®	6 h
4	1	Opti-MEM® al 10 % + suero	6 h
5	1	Opti-MEM®	24 h
6	1	Opti-MEM® al 10 % + suero	24 h
7	4	Opti-MEM®	3 h
8	4	Opti-MEM® al 10 % + suero	3 h
9	4	Opti-MEM®	6 h
10	4	Opti-MEM® al 10 % + suero	6 h
11	4	Opti-MEM®	24 h
12	4	Opti-MEM® al 10 % + suero	24 h
13	10	Opti-MEM®	3 h

Pocillo	Cantidad de ADN (ug)	Medio de transfección (Optimem, OptiMEM + Suero al 10 %)	Tiempo de transfección (h)
14	10	Opti-MEM® al 10 % + suero	3 h
15	10	Opti-MEM®	6 h
16	10	Opti-MEM® al 10 % + suero	6 h
17	10	Opti-MEM®	24 h
18	10	Opti-MEM® al 10 % + suero	24 h

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> The University of Nottingham	
	<120> Transducción	
	<130> JA66493P.WOP	
10	<150> GB1322396.1	
	<151> 18/12/2013	
	<160> 55	
15	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
	<211> 21	
	<212> PRT	
20	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 1	
	Lys Arg Lys Lys Lys Gly Lys Gly Leu Gly Lys Lys Arg Asp Pro Cys	
	1 5 10 15	
	Leu Arg Lys Tyr Lys	
	20	
25	<210> 2	
	<211> 63	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 2	
	aagcgcaaga agaagggcaa aggcctgggc aagaagcgcg atccgtgcct gcgcaagtat	60
	aag	63
35	<210> 3	
	<211> 18	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 3	

ES 2 733 286 T3

Gly Arg Pro Arg Glu Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Leu Lys
1 5 10 15

Pro Thr

<210> 4
<211> 54
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 4
ggccgcccgc gcgaaagcgg caaaaaacgc aaacgcaaac gcctgaaacc gacc 54

<210> 5
<211> 20
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val
1 5 10 15

Ala Leu Asn Gln
20

<210> 6
<211> 60
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 6
acctatcgca gcgcgaaatg gaccataac ggcggcgaaa tggtgtggc gctgaaccag 60

<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg
1 5 10 15

<210> 8
<211> 48
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 8
acctatcgca gccgcaaata taccagctgg tatgtggcgc tgaaacgc 48

<210> 9
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del dominio de transducción

<400> 9
cgaagacgca ggagacgtcg aagg 24

5 <210> 10
<211> 88
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia de molécula de administración

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (64)..(64)
<223> n es a, c, g o t

<400> 10

aagcgcaaga agaagggcaa aggcctgggc aagaagcgcg atccgtgcct gcgcaagtat 60

aagncgaaga cgcaggagac gtcgaagg 88

20 <210> 11
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Molécula de unión

30 <400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Arg Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn
20 25 30

Glu Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Arg Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80

Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Gly Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys Gly Arg
85 90 95

Arg Leu Lys Asp Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro
100 105 110

Pro Thr Pro Ser Pro Ser
115

<210> 12
<211> 354

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Molécula de unión

<400> 12

```

gaagtgcagc  tgggtgaaag  cggcggcggc  ctggtgcagc  cgcgcggcag  cctgcgcctg      60
agctgcgcgg  cgagcggcctt  taccgtgagc  agcaacgaaa  tgagctggat  tcgccaggcg     120
ccgggcaaag  gcctggaatg  ggtgagcagc  attagcggcg  gcagcaccta  ttatgcggat     180
agccgcaaag  gccgctttac  cattagccgc  gataacagca  aaaacaccct  gtatctgcag     240
atgaacaacc  tgcgcgcgga  aggcaccgcg  gcgtattatt  gcggccgccg  cctgaaagat     300
ccgagcacc  cgccgacccc  gagcccgagc  accccgccga  ccccgagccc  gagg           354

```

<210> 13
<211> 129
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Molécula de unión

<400> 13

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn
          20          25          30

Glu Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Gln Glu Arg Trp Ala Val
          35          40          45

Ala Ala Ile Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
          50          55          60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Thr Leu Gln
65          70          75          80

Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Gly Arg
          85          90          95

Arg Leu Lys Asp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Pro
          100          105          110

Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro
          115          120          125

Ser

```

<210> 14
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Molécula de unión

<400> 14

10

```

caggtgcagc tgggtggaaag cggcggcggc agcgtgcagg cgggcggcag cctgcgcctg      60
agctgcaccg cgagcggctt tacctgtagc agcaacgaac tgggctggtt tcgccaggcg      120
ccgggccagg aacgctgggc ggtggcggcg attagcggcg gcagcaccta ttatgcggat      180
agcgtgaaag gccgctttac cattagccgc gataacgcga aaaacaccgt gaccctgcag      240
atgaacaacc tgaaacccga agataccgcg atttattatt gcggccgccg cctgaaagat      300
tggggccagg gcacccagggt gaccgtgagc agcccgagca ccccgccgac cccgagcccg      360
agcaccgccg cgaccccgag cccgagc      387

```

<210> 15
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Molécula de unión

20

<400> 15

```

Glu Asp Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15

Ser Leu Arg Pro Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
                20           25           30

Ala Leu His Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35           40           45

Ser Ala Ile Gly Thr Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Met
        50           55           60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr Leu
65           70           75           80

His Met Asn Ser Leu Ile Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
        85           90           95

Leu Arg Met Asn Gly Trp Arg Ala His Gln Pro Ser Thr Pro Pro Thr
        100           105           110

Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser
        115           120

```

5 <210> 16
<211> 372
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Molécula de unión

10 <400> 16

```

gaagatcagc tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcagc cgggcggcag cctgcgcccg      60
agctgcgcgg cgagcggctt tgcgtttagc agctatgcgc tgcattgggt gcgccgcgcg      120
ccgggcaaag gcctggaatg ggtgagcgcg attggcaccg gcggcgatac ctattatgcg      180
gatagcgtga tgggccgctt taccattagc cgcgataacg cgaaaaaaag cctgtatctg      240
catatgaaca gcctgattgc ggaagatatg gcggtgtatt attgcagcct gcgcatgaac      300
ggctggcgcg cgcacagcc gagcaccg cgcacccga gcccgagcac ccgcccgcacc      360
ccgagcccga gc                                     372

```

15 <210> 17
<211> 135
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Molécula de unión

<400> 17

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1           5           10           15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20           25           30

Ala Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Gln Glu Arg Trp Ala Val
35           40           45

Ala Ala Ile Gly Thr Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50           55           60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Thr Leu
65           70           75           80

Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ser
85           90           95

Leu Arg Met Asn Gly Trp Arg Ala His Gln Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100          105          110

```

25

ES 2 733 286 T3

Val Thr Val Ser Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr
115 120 125

Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser
130 135

5 <210> 18
<211> 405
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Molécula de unión
<400> 18

caggtgcagc	tggtggaaag	cggcggcggc	agcgtgcagg	cgggcggcag	cctgcgcctg	60
agctgcaccg	cgagcggcctt	tgcgttttagc	agctatgcgc	tgggctgggtt	tcgccaggcg	120
ccgggccagc	aacgctgggc	ggtggcggcg	attggcaccg	gcggcgatac	ctattatgcg	180
gatagcgtga	aaggccgctt	taccattagc	cgcgataacg	cgaaaaacac	cgtgaccctg	240
cagatgaaca	acctgaaacc	ggaagatacc	gcgattttatt	attgcagcct	gcgcatgaac	300
ggctggcgcg	cgcatcagtg	gggccagggc	acccaggtga	ccgtgagcag	cccgagcacc	360
ccgccgaccc	cgagcccagc	caccccgccg	accccgagcc	cgagc		405

15 <210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Dominio de transducción
<400> 19

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

25 <210> 20
<211> 9
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio de transducción
35 <400> 20

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

40 <210> 21
<211> 8
<212> PRT

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> CDR	
5	<400> 21	
		Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn Glu
		1 5
10	<210> 22	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> CDR	
	<400> 22	
		Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Ala
		1 5
20		
	<210> 23	
	<211> 6	
	<212> PRT	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> CDR	
30	<400> 23	
		Ile Ser Gly Gly Ser Thr
		1 5
35	<210> 24	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> CDR	
	<400> 24	
		Ile Gly Thr Gly Gly Asp Thr
		1 5
45	<210> 25	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> CDR	
	<400> 25	
55		

ES 2 733 286 T3

		Gly	Arg	Arg	Leu	Lys	Asp		
		1				5			
5	<210> 26								
	<211> 11								
	<212> PRT								
	<213> Secuencia artificial								
10	<220>								
	<223> CDR								
	<400> 26								
		Ser	Leu	Arg	Met	Asn	Gly	Trp	Arg
		1				5			Ala
									His
									Gln
15	<210> 27								
	<211> 6								
	<212> PRT								
	<213> Secuencia artificial								
20	<220>								
	<223> CDR								
	<400> 27								
25		Gly	Met	Arg	Pro	Arg	Leu		
		1				5			
30	<210> 28								
	<211> 11								
	<212> PRT								
	<213> Secuencia artificial								
	<220>								
	<223> CDR								
35	<400> 28								
		His	Ala	Pro	Leu	Arg	Asn	Thr	Arg
		1				5			Thr
									Asn
									Thr
40	<210> 29								
	<211> 6								
	<212> PRT								
	<213> Secuencia artificial								
45	<220>								
	<223> CDR								
	<400> 29								
50		Gly	Ser	Arg	Ser	Ser	Arg		
		1				5			
55	<210> 30								
	<211> 7								
	<212> PRT								
	<213> Secuencia artificial								

ES 2 733 286 T3

	<220>	
	<223> CDR	
5	<400> 30	
		Gly Arg Thr Val Gly Arg Asn
		1 5
10	<210> 31	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> CDR	
	<400> 31	
		Gly Lys Val Lys Leu Pro Asn
		1 5
20	<210> 32	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> CDR	
	<400> 32	
		Ser Gly Arg Lys Gly Arg Met Arg
30		1 5
	<210> 33	
	<211> 7	
35	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> CDR	
40	<400> 33	
		Arg Arg Tyr Ala Leu Asp Tyr
		1 5
45	<210> 34	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> CDR	
	<400> 34	
		Leu Lys Gln Gln Gly Ile Ser
		1 5

ES 2 733 286 T3

<210> 35
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> CDR
 <400> 35
 10
 Ala Met Thr Gln Lys Lys Pro Arg Lys Leu Ser Leu
 1 5 10
 <210> 36
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> CDR
 20
 <400> 36
 Ser Gly Arg Lys Tyr Phe Arg Ala Arg Asp Met Asn
 1 5 10
 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Dominio de transducción
 30
 <400> 37
 Arg Gln Ile Lys Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15
 35
 <210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Dominio de transducción
 45
 <400> 38
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10
 <210> 39
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Dominio de transducción
 55
 <400> 39

Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe Ser Thr Ser Thr
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio de transducción

<400> 40

Arg Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe
1 5 10

<210> 41
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio de transducción

<400> 41

Pro Ile Arg Arg Arg Lys Lys Leu Arg Arg Leu Lys
1 5 10

<210> 42
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio de transducción

<400> 42

Arg Arg Gln Arg Arg Thr Ser Lys Leu Met Lys Arg
1 5 10

<210> 43
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio de transducción

<400> 43

Arg Arg Arg Arg Asn Arg Thr Arg Arg Asn Arg Arg Arg Val Arg
1 5 10 15

<210> 44
<211> 19

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Dominio de transducción
 <400> 44
 Lys Met Thr Arg Ala Gln Arg Arg Ala Ala Ala Arg Arg Asn Arg Trp
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg
 10
 <210> 45
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Dominio de transducción
 <400> 45
 20
 Thr Arg Arg Gln Arg Thr Arg Arg Ala Arg Arg Asn Arg
 1 5 10
 <210> 46
 <211> 13
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio de transducción
 30
 <400> 46
 Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
 1 5 10
 35
 <210> 47
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Dominio de transducción
 <400> 47
 Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Pro Gln
 1 5 10
 45
 <210> 48
 <211> 27
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio de transducción

<400> 48

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu
1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
20 25

5 <210> 49
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Dominio de transducción

<400> 49

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Ala Leu Lys Leu
1 5 10 15

15 Ala

<210> 50
<211> 27
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio de transducción

25 <400> 50

Met Gly Leu Gly Leu His Leu Leu Val Leu Ala Ala Ala Leu Gln Gly
1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
20 25

30 <210> 51
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Dominio de transducción

<400> 51

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
20 25

40 <210> 52
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio de transducción

<400> 52

5

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
20 25

<210> 53

<211> 27

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio de transducción

15

<400> 53

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Ser Lys Arg Lys Val
20 25

20

<210> 54

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Dominio de transducción

<400> 54

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
1 5 10 15

30

Lys Lys Arg Lys Val
20

<210> 55

<211> 21

35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio de transducción

40

<400> 55

Lys Glu Thr Trp Phe Glu Thr Trp Phe Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val
20

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de administración para la transducción de una carga en una célula que comprende:

- 5 (A) una carga o una molécula de unión a la carga para unirse a una carga, y opcionalmente en el que la carga está unida a la molécula de unión a la carga;
 (B) un elemento de unión a glucosaminoglicano (GAG) que comprende:

- 10 (i) un dominio de unión a heparina, o una variante funcional del mismo, que es capaz de unirse al sulfato de heparina-glucosaminoglicano (HS-GAG) en la superficie de la célula, o
 (ii) un anticuerpo de unión a GAG, o un fragmento de unión del mismo funcional;

y

- 15 (C) un dominio de transducción de proteínas.

2. La molécula de administración de la reivindicación 1, en la que el elemento de unión a GAG comprende P21 de HB-EGF; o una variante truncada, extendida o funcional del mismo; o

en la que el elemento de unión a GAG comprende un dominio de unión a heparina de un factor de crecimiento de fibroblastos, o una variante funcional del mismo; o

- 20 en la que el elemento de unión a GAG comprende FGF, tal como FGF1A, FGF2A, FGF2B, FGF4A, FGF1C, FGF2C, FGF4C, FGF7B o FGF7C, antitrombina, tal como ATIII, BMP, Wnts, Shh EGF, VEGF, o PDGF, o variantes de los mismos; o

en la que el elemento de unión a GAG comprende cualquiera de FGF2B, FGF7B, o PDGF.

- 25 3. La molécula de administración de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo de unión a GAG comprende un anticuerpo de dominio único, o un fragmento de unión del mismo funcional.

4. La molécula de administración de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que el dominio de transducción de proteínas es hidrófilo o anfifílico; y/o

- 30 en la que el dominio de transducción de proteínas comprende una mayoría de residuos de aminoácidos hidrófilos.

5. La molécula de administración de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que el dominio de transducción de proteínas comprende una mayoría de residuos de aminoácidos de arginina y/o lisina.

- 35 6. La molécula de administración de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el dominio de transducción de proteínas se selecciona de cualquiera de los grupos que comprenden:

Penetratina o Antenapedia PTD RQIKWFWQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 37);

TAT YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 38);

- 40 SynB1 RGGRLSYRRRFSTSTGR (SEQ ID NO: 39);

SynB3 RRLSYRRRF (SEQ ID NO: 40);

PTD-4 PIRRRKKLRLK (SEQ ID NO: 41);

PTD-5 RRQRRTSKLMKR (SEQ ID NO: 42);

FHV Coat-(35-49) RRRNRTRRNRVR (SEQ ID NO: 43);

- 45 BMV Gag-(7-25) KMTRAQRRAAARRNRWTAR (SEQ ID NO: 44);

HTLV-II Rex-(4-16) TRRQTRRRARRNR (SEQ ID NO: 45);

D-Tat GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 46);

R9-Tat GRRRRRRRRRPPQ (SEQ ID NO: 47);

Quimera Transportán GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 48);

- 50 MAP KLALKLALKLALALKLA (SEQ ID NO: 49);

SBP MGLGLHLLVLAALQGAWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 50);

FBP GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 51);

MPG ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV-cya (SEQ ID NO: 52);

MPG(NLS) ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPSKRKV-cya (SEQ ID NO: 53);

- 55 Pep-1 ac-KETWWETWWTEWSQPKKKRKV-cya (SEQ ID NO: 54); y

Pep-2 ac-KETWFETWTEWSQPKKKRKV-cya (SEQ ID NO: 55); o poliargininas, tales como quimera RxN (4<N<17), polilisinas, tales como quimera KxN (4<N<17), (RAcA)6R, (RABu)6R, (RG)6R, (RM)6R, (RT)6R, (RS)6R, R10, (RA)6R, R7 y R8; o

en la que el dominio de transducción de proteínas comprende aproximadamente 8 residuos de arginina.

- 60 7. La molécula de administración de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que la carga se selecciona de cualquiera de los grupos que comprenden un péptido, una proteína, un ácido nucleico y una nanopartícula; y/o

en la que la carga se selecciona de cualquiera de los grupos que comprenden una molécula terapéutica; un fármaco; un profármaco; una proteína o péptido funcional, tal como una enzima o un factor de transcripción; una proteína o

- 65 péptido microbiano; y una toxina; o ácido nucleico que codifica los mismos: y/o

en la que la molécula de unión a la carga comprende cualquiera de un péptido, una proteína, estreptavidina, una

molécula de unión a ácido nucleico, un anticuerpo, o fragmento del mismo, un mimético de anticuerpo, una molécula enlazadora química, una etiqueta de afinidad, o una molécula marcada de afinidad.

- 5 8. Un método para transducir una carga en una célula *in vitro* que comprende:
proporcionar una molécula de administración de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y
poner en contacto la célula con la molécula de administración.
- 10 9. Una célula que comprende o codifica la molécula de administración de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 10 10. Un ácido nucleico que codifica la molécula de administración de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y
opcionalmente, en el que el ácido nucleico es un vector para la expresión de la molécula de administración
- 15 11. Uso de la molécula de administración de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para acompañar *in vitro* una carga en una célula por transducción.
- 20 12. Una molécula de administración de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una célula de acuerdo con la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad.
- 20 13. Un método para modificar la función celular en un cultivo celular que comprende administrar una composición que comprende una molécula de administración de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7.
- 25 14. Un método para inducir una célula madre pluripotente *in vitro* por transducción de una o más moléculas de administración de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en una célula no pluripotente.
- 30 15. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de administración de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o que comprende una célula de acuerdo con la reivindicación 9, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 16. La molécula de administración de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la carga comprende una nanopartícula, para su uso en imágenes de células.

Figura 1

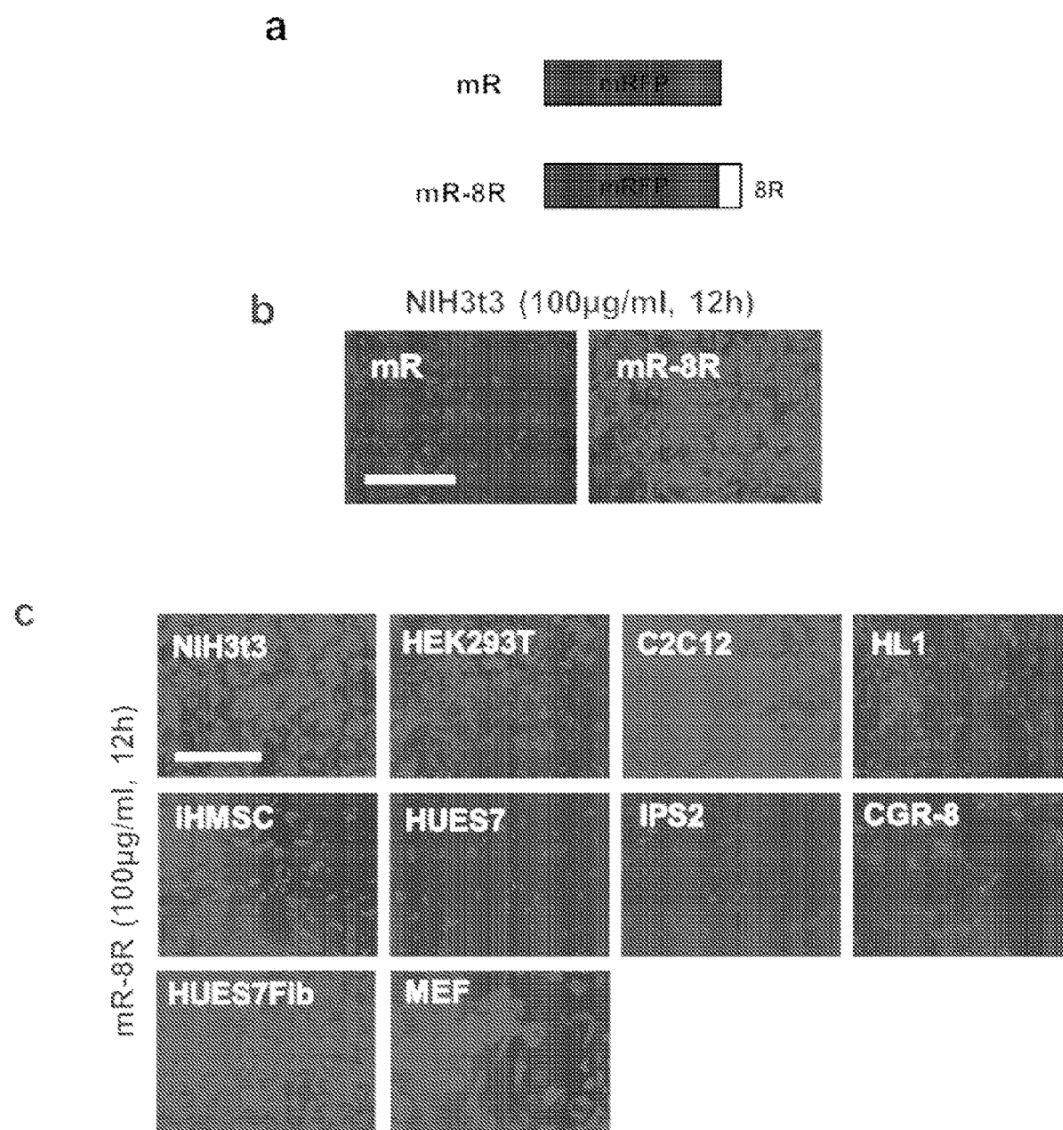
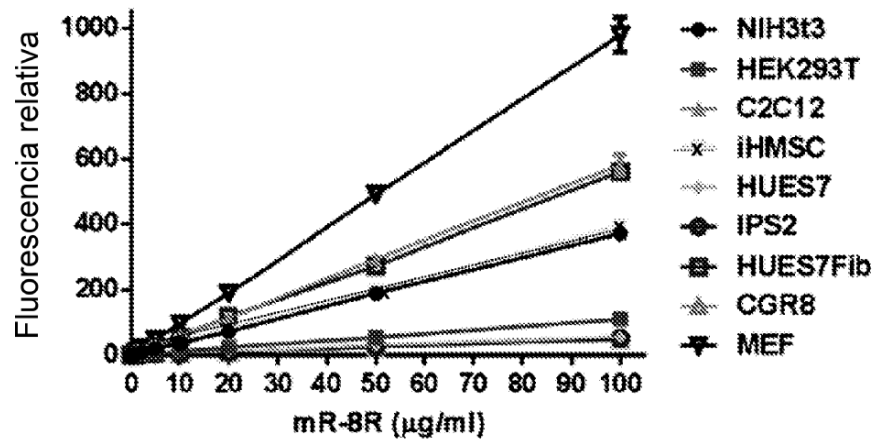


Figura 1 continuación

d



e

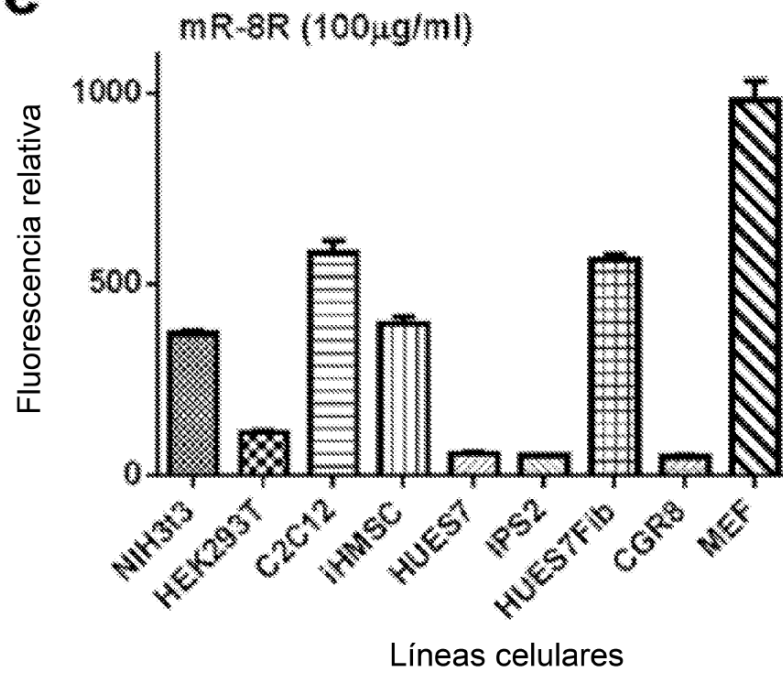


Figura 2

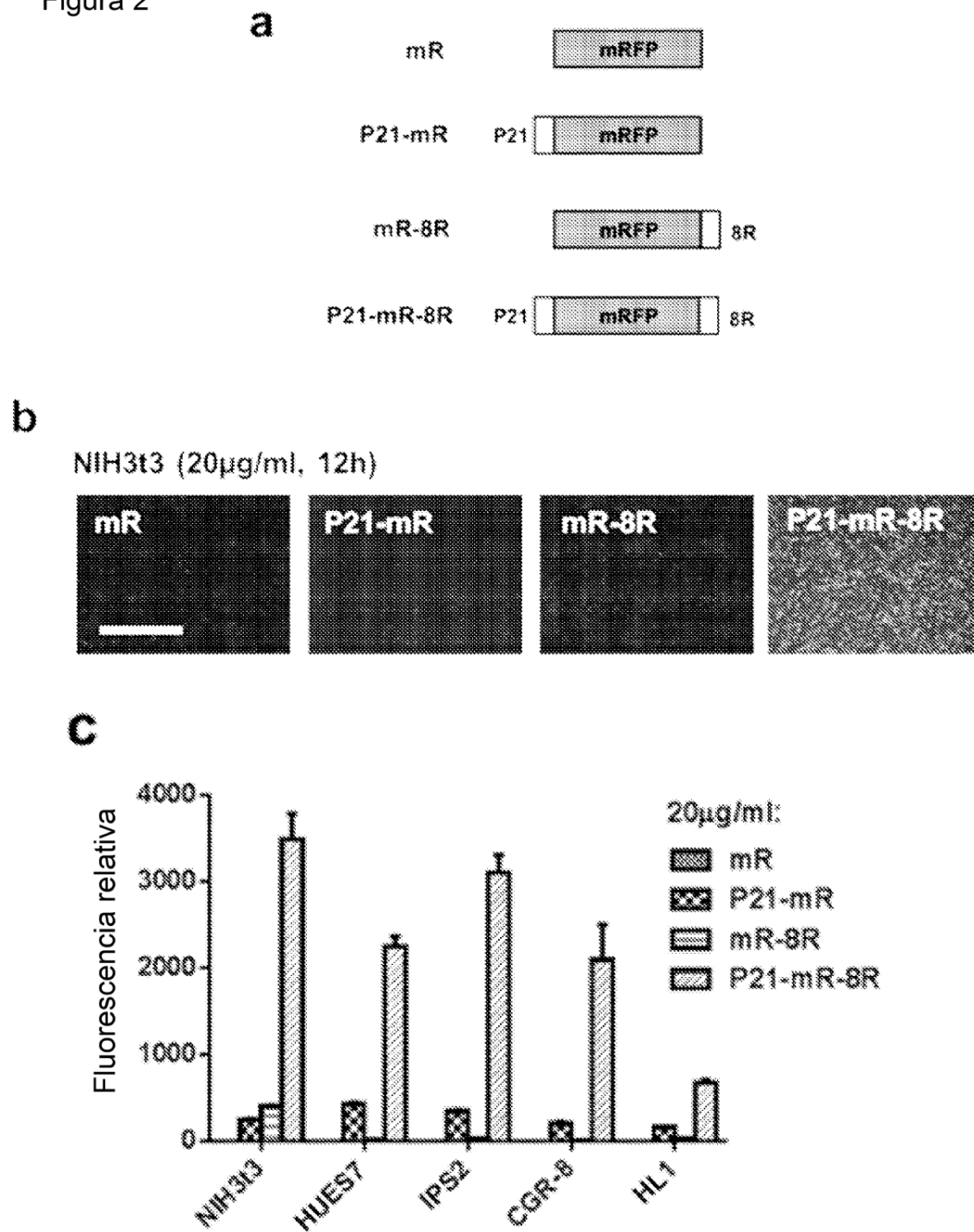


Figura 2 continuación

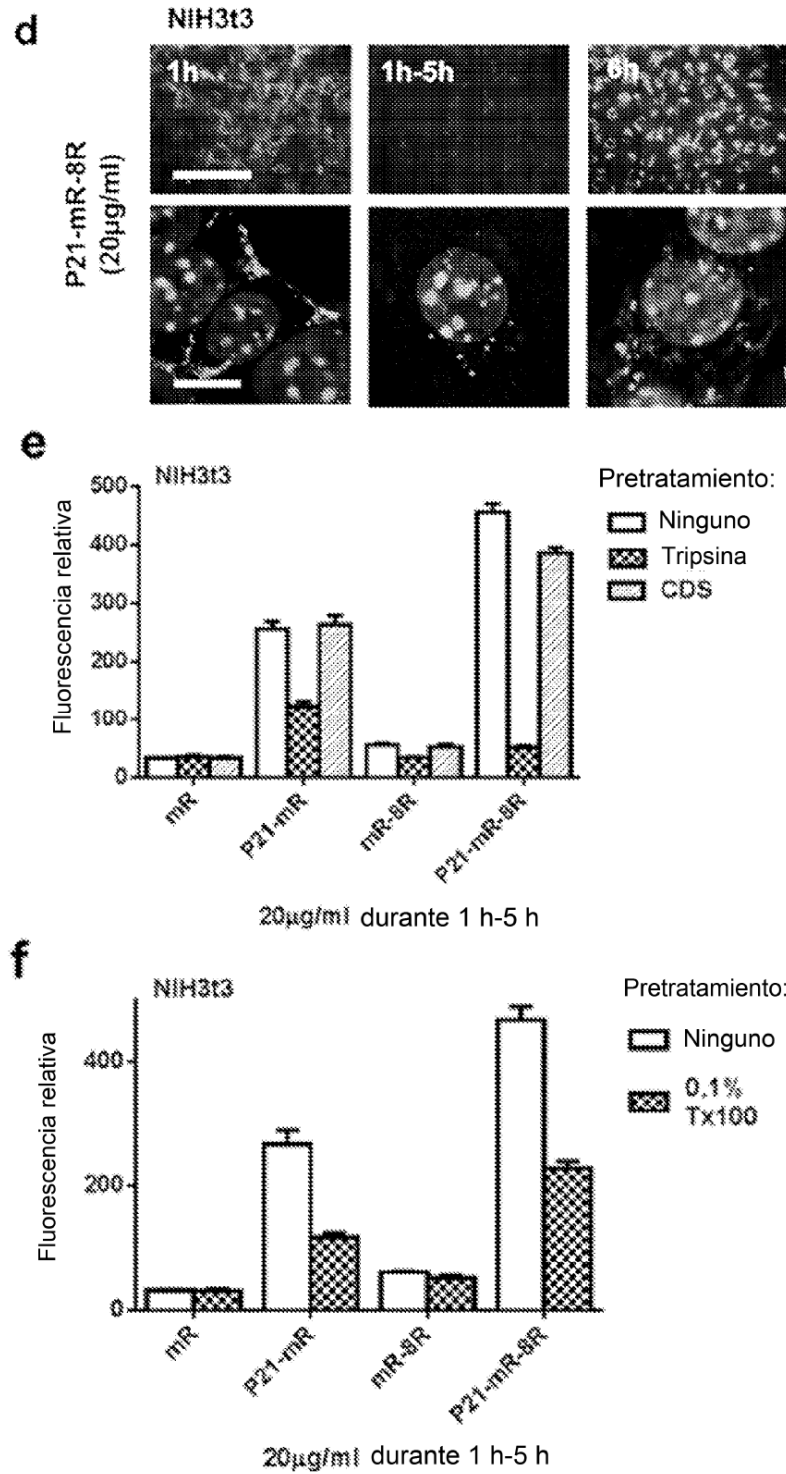


Figura 3

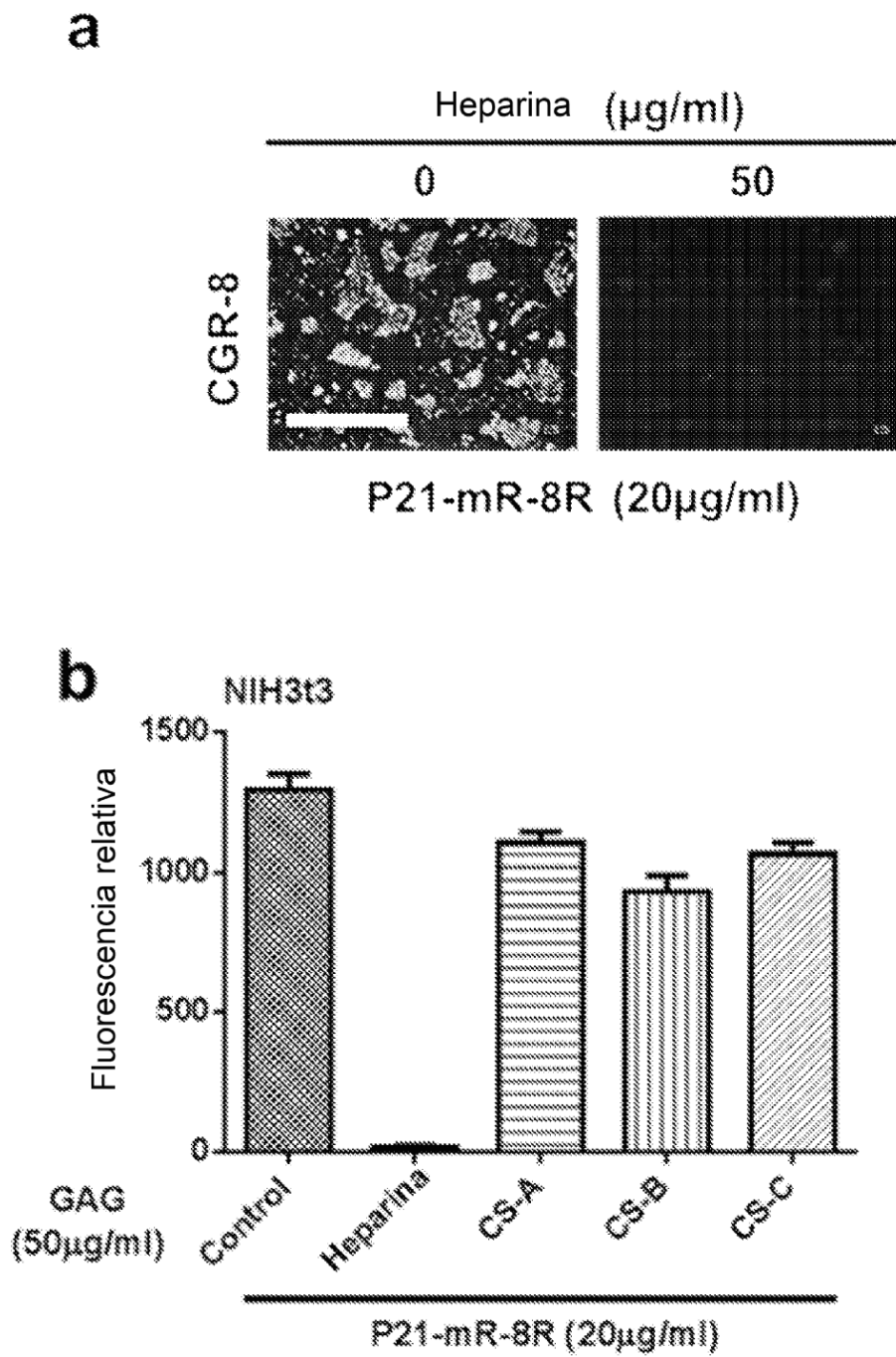


Figura 3 continuación

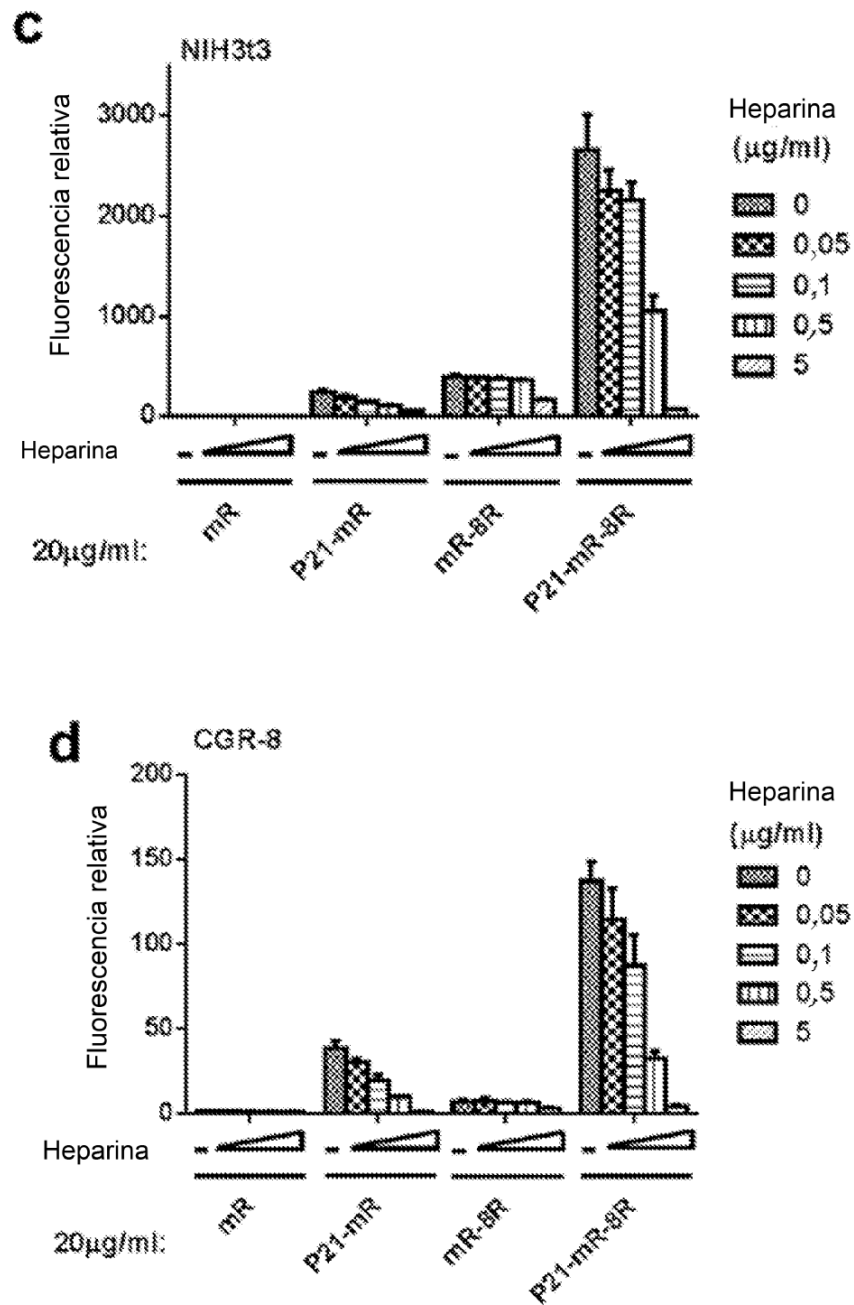


Figura 3 continuación

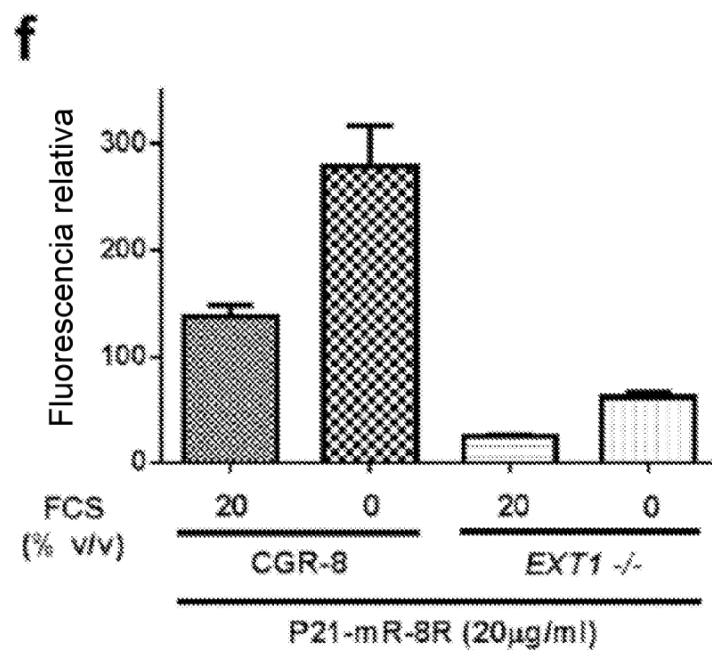
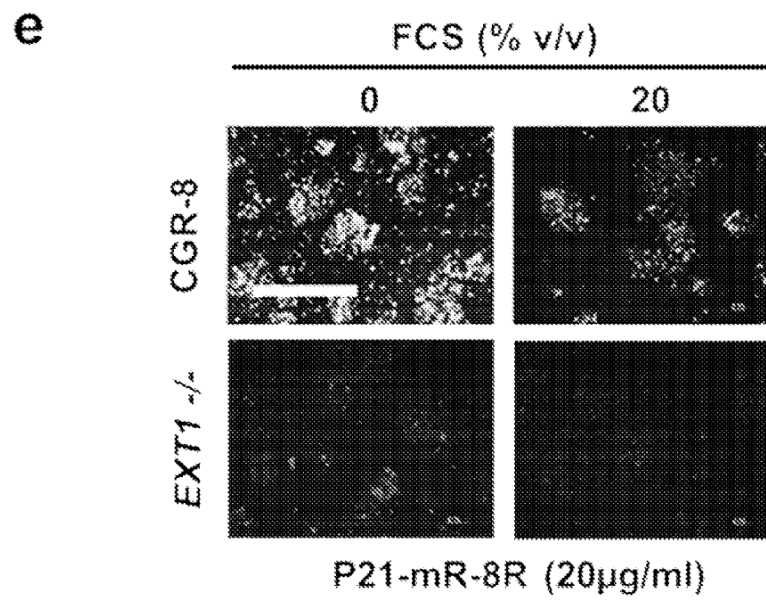


Figura 4

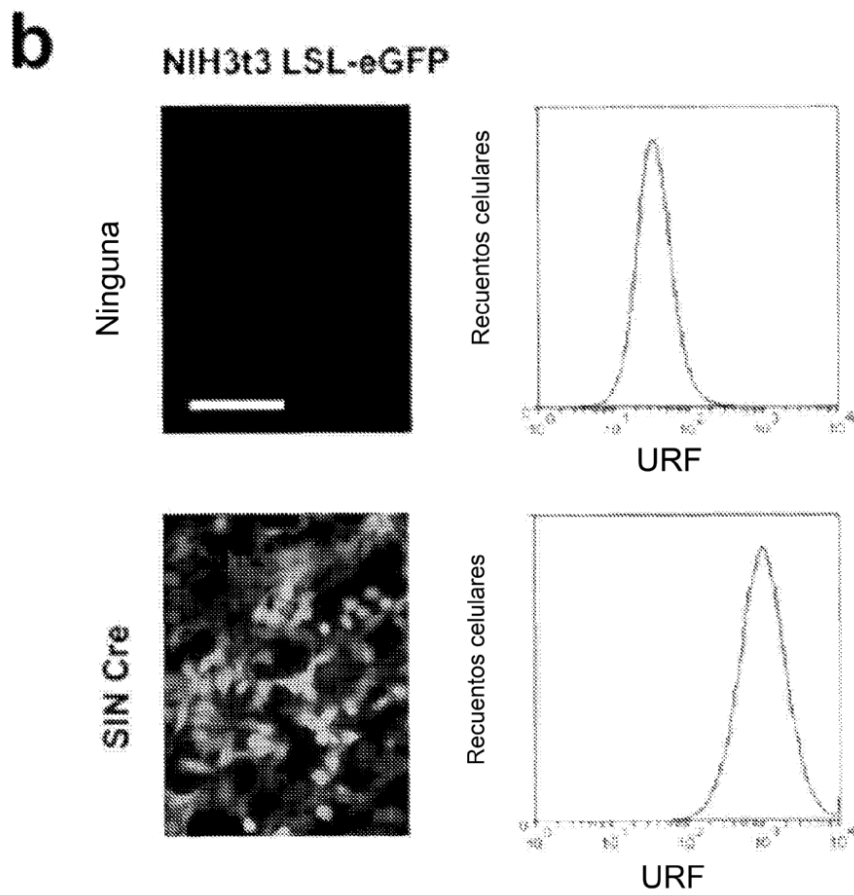
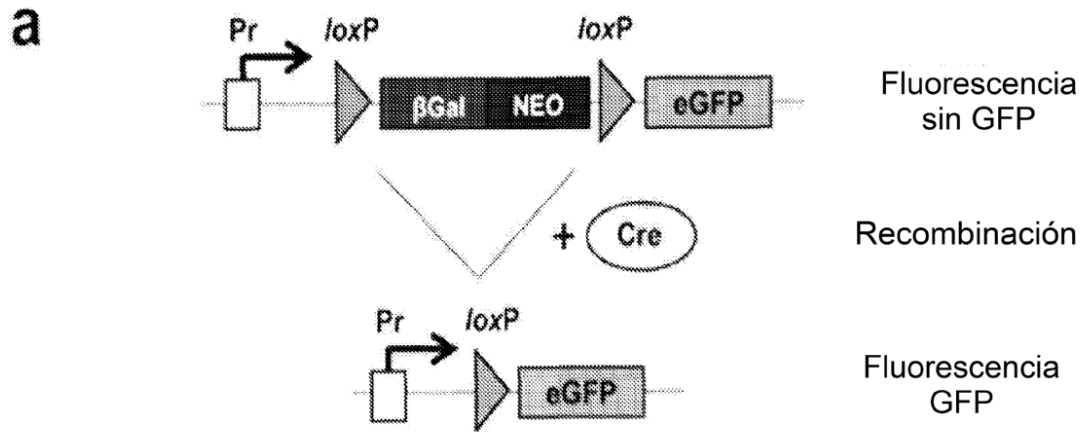


Figura 4 continuación

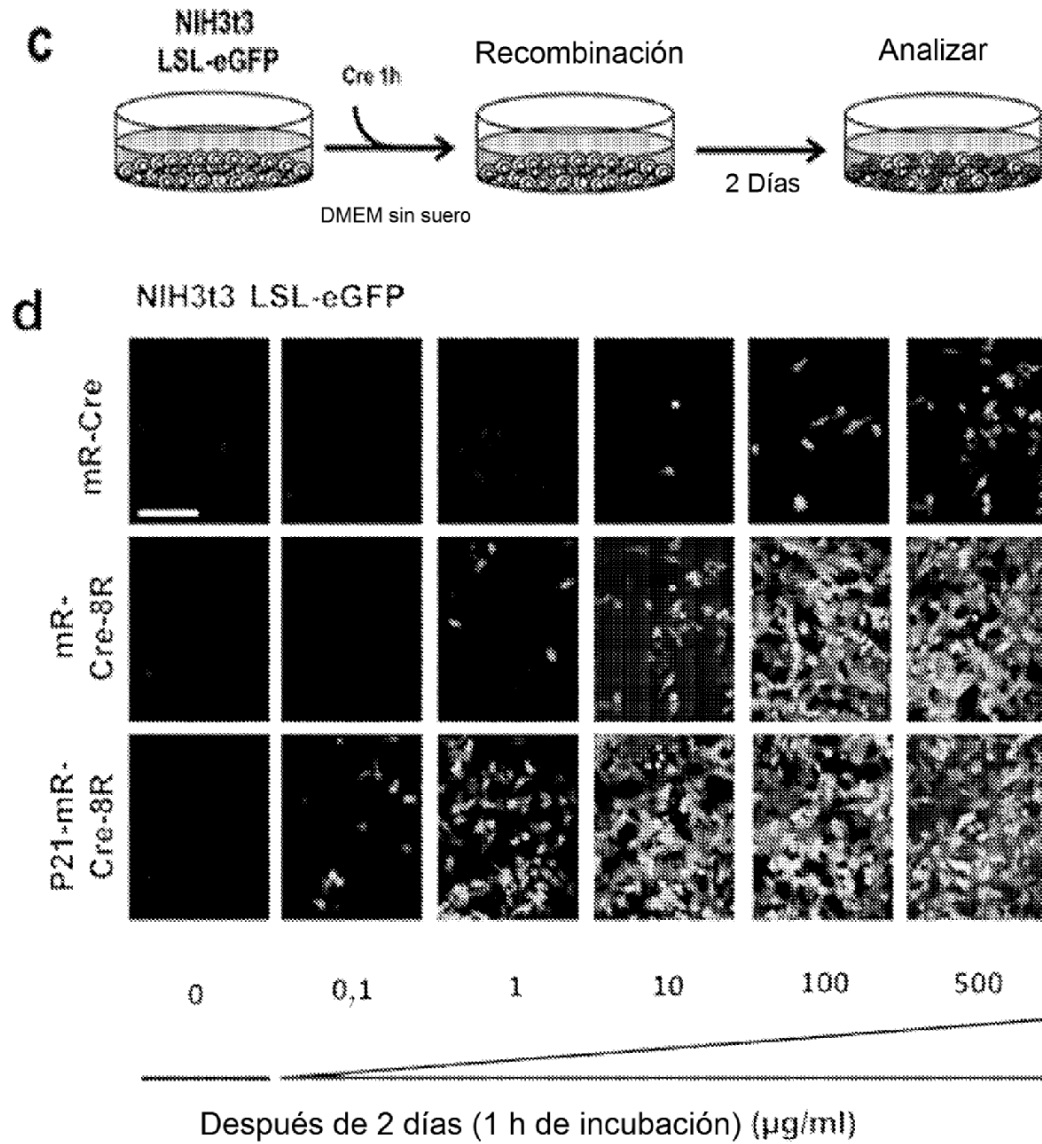


Figura 4 continuación

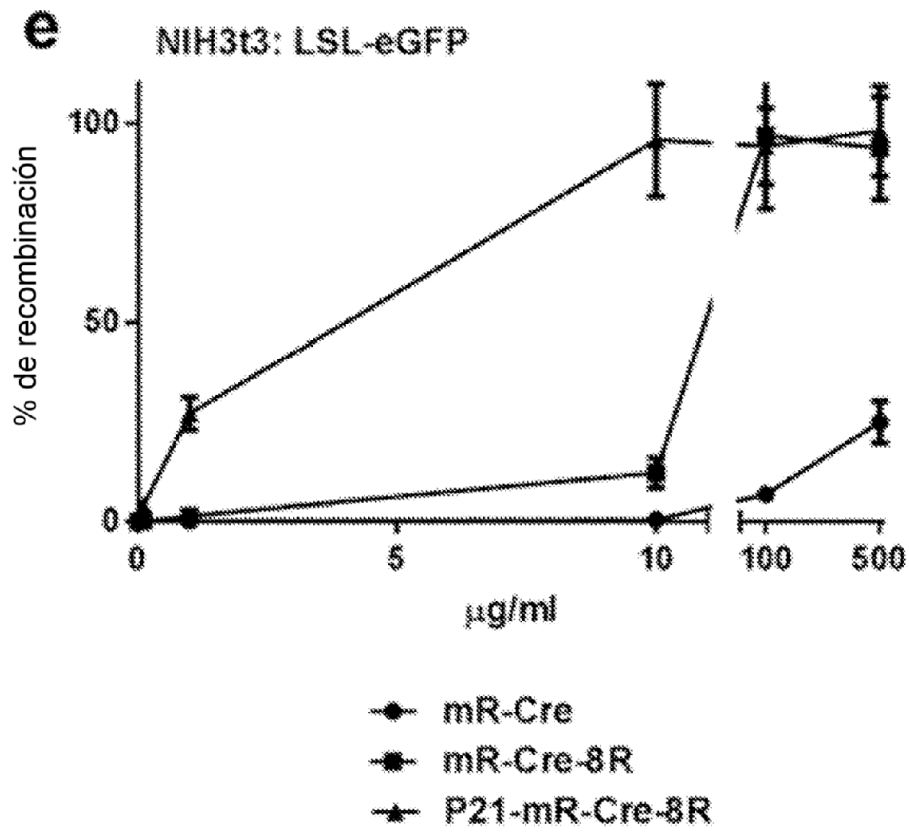


Figura 5

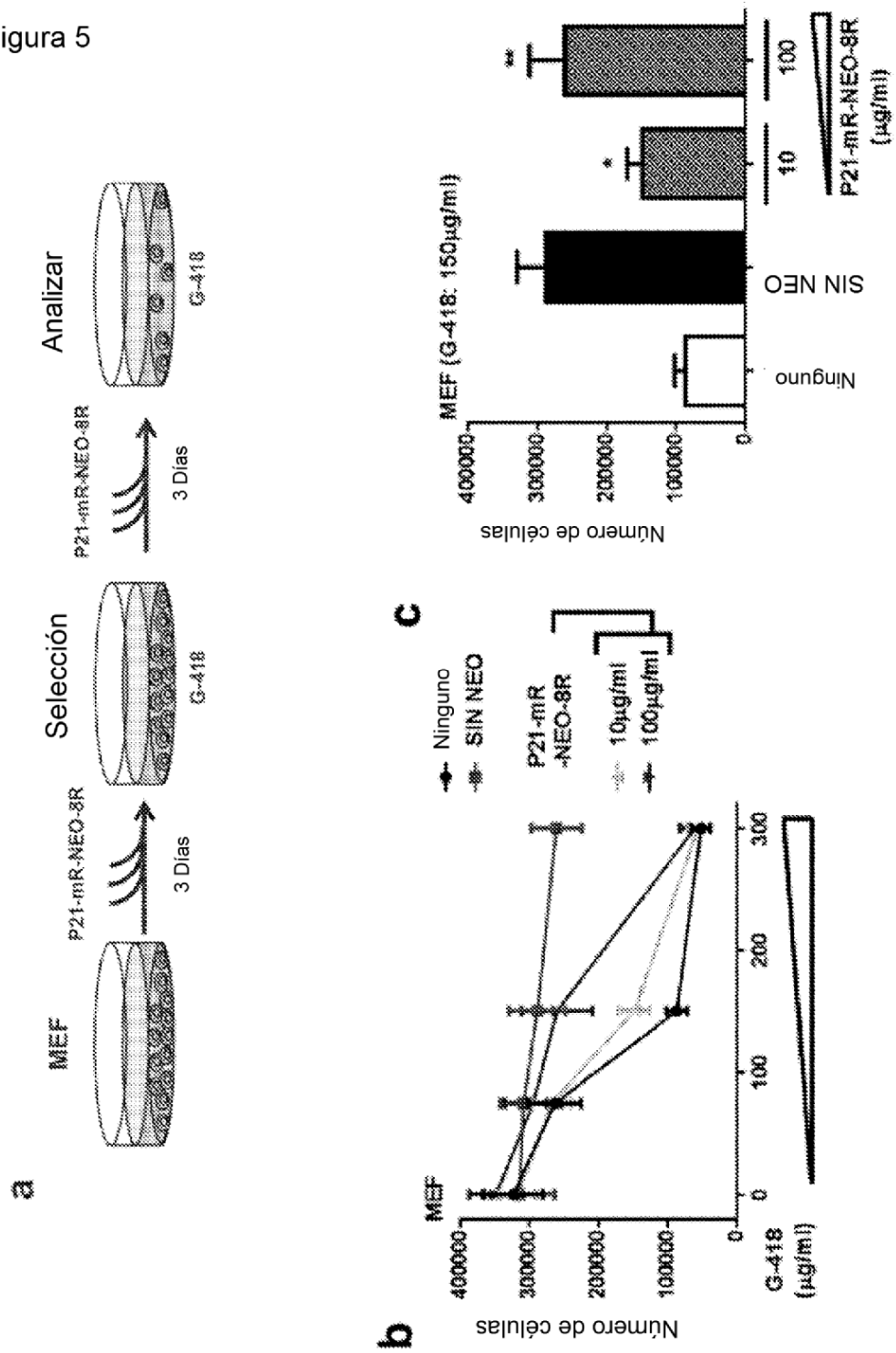


Figura 5 continuación

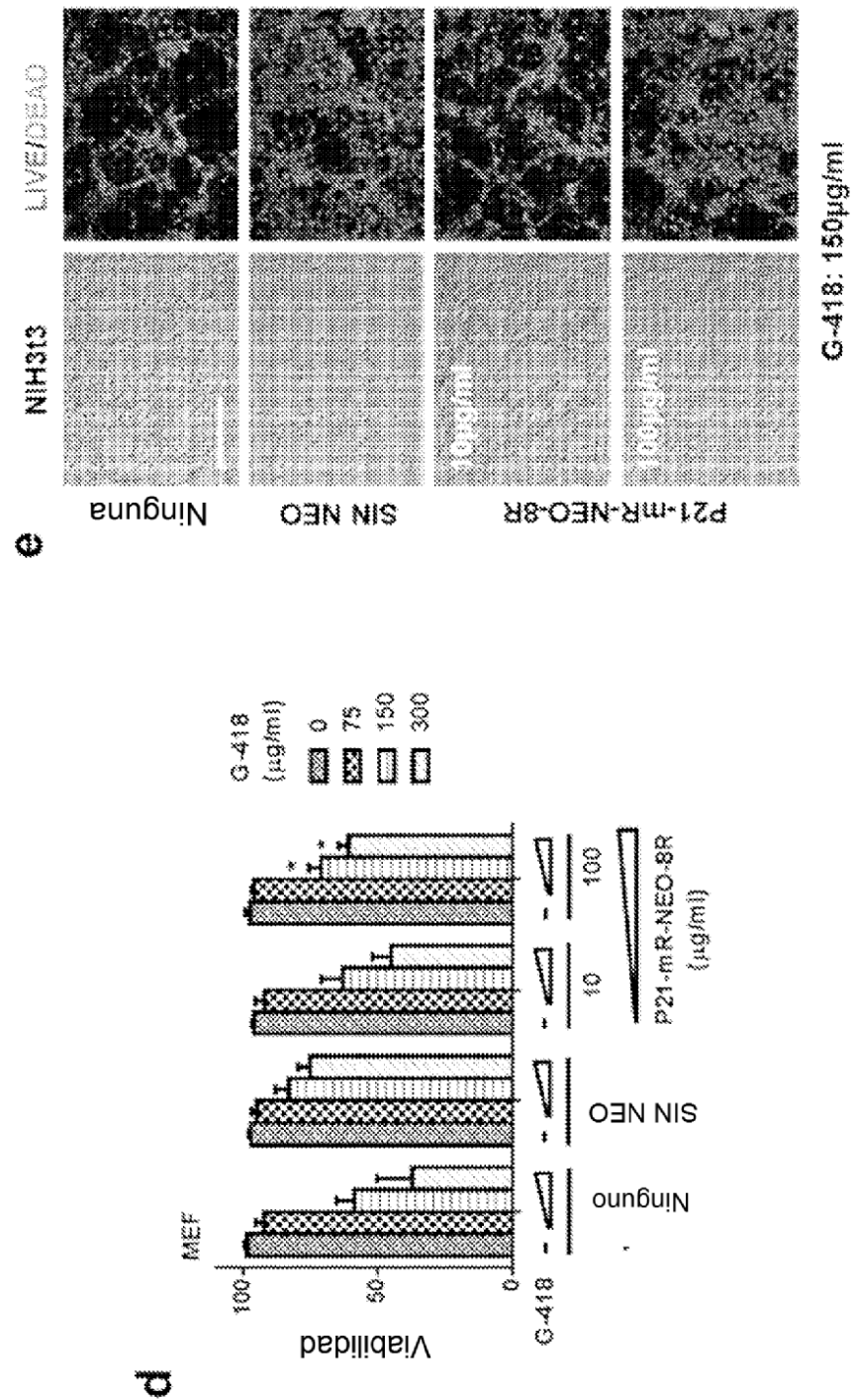


Figura 6

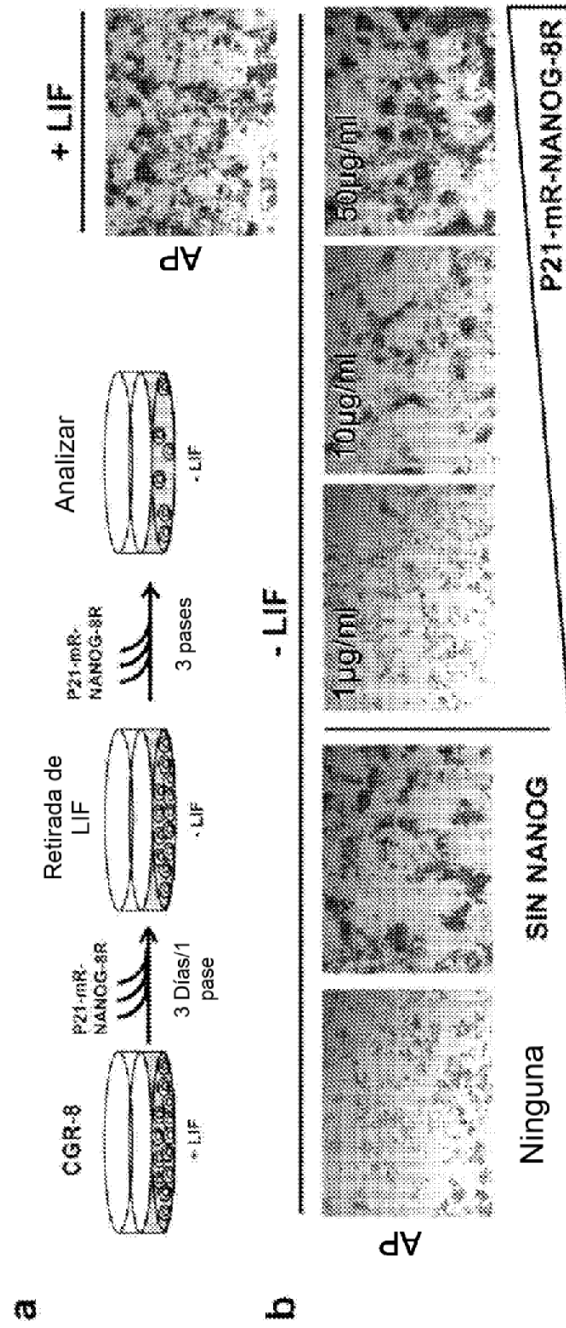


Figura 6

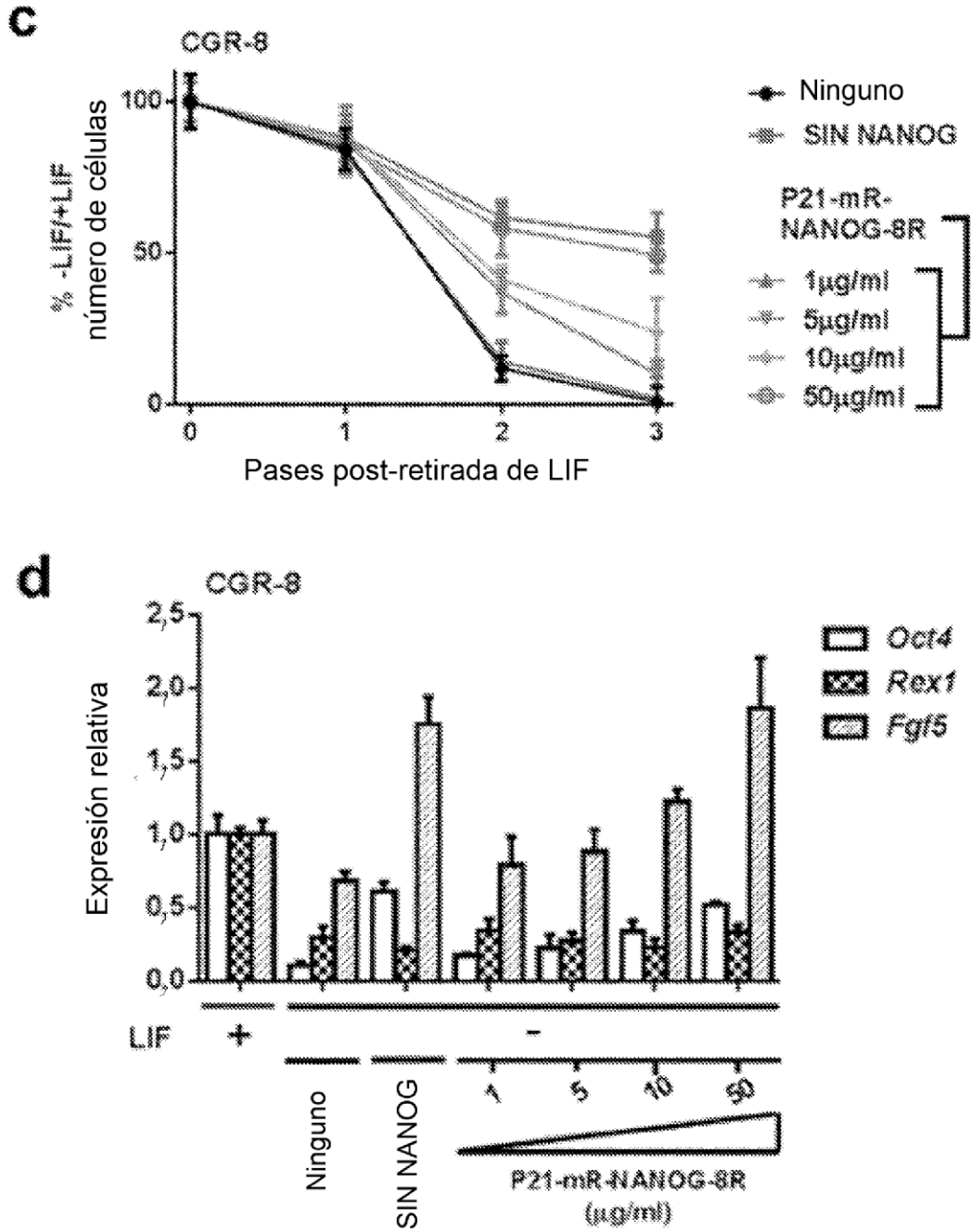


Figura 7

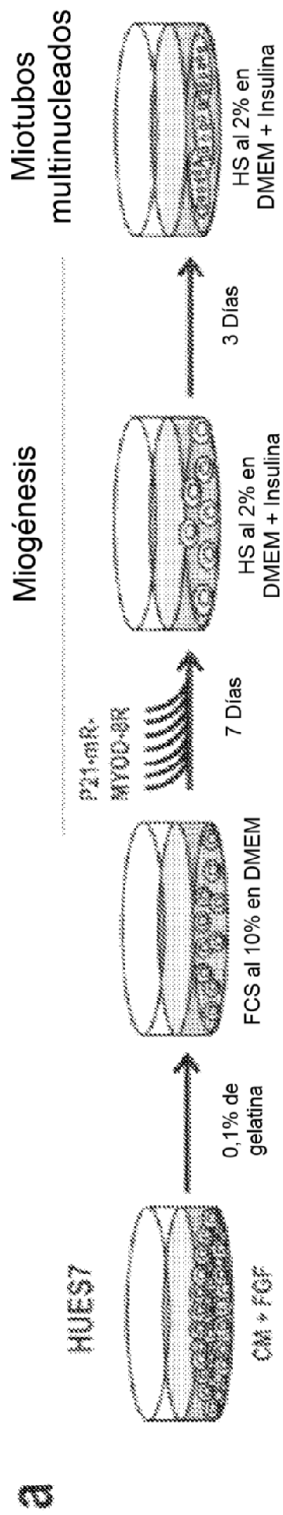


Figura 7 continuación

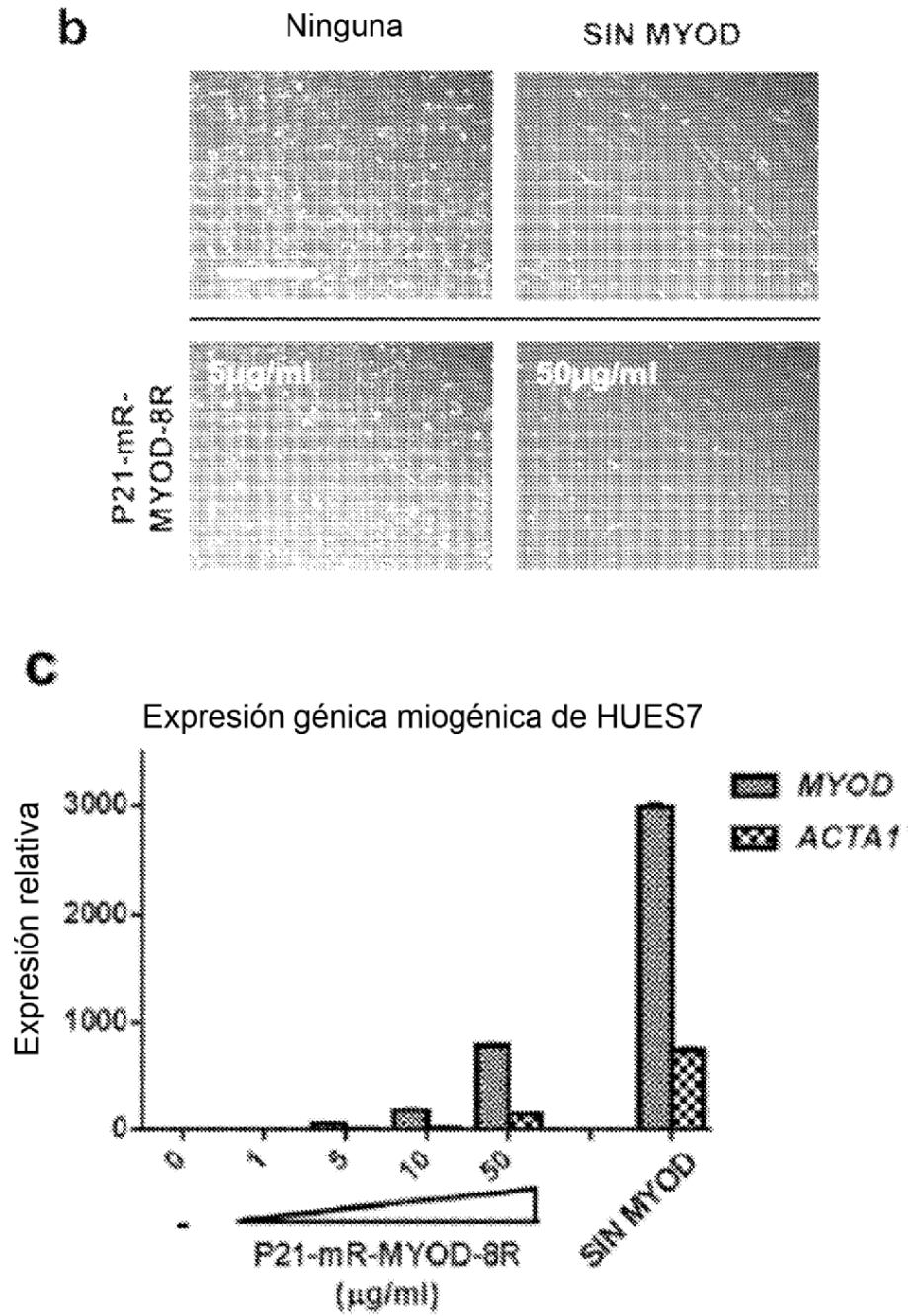


Figura 7 continuación

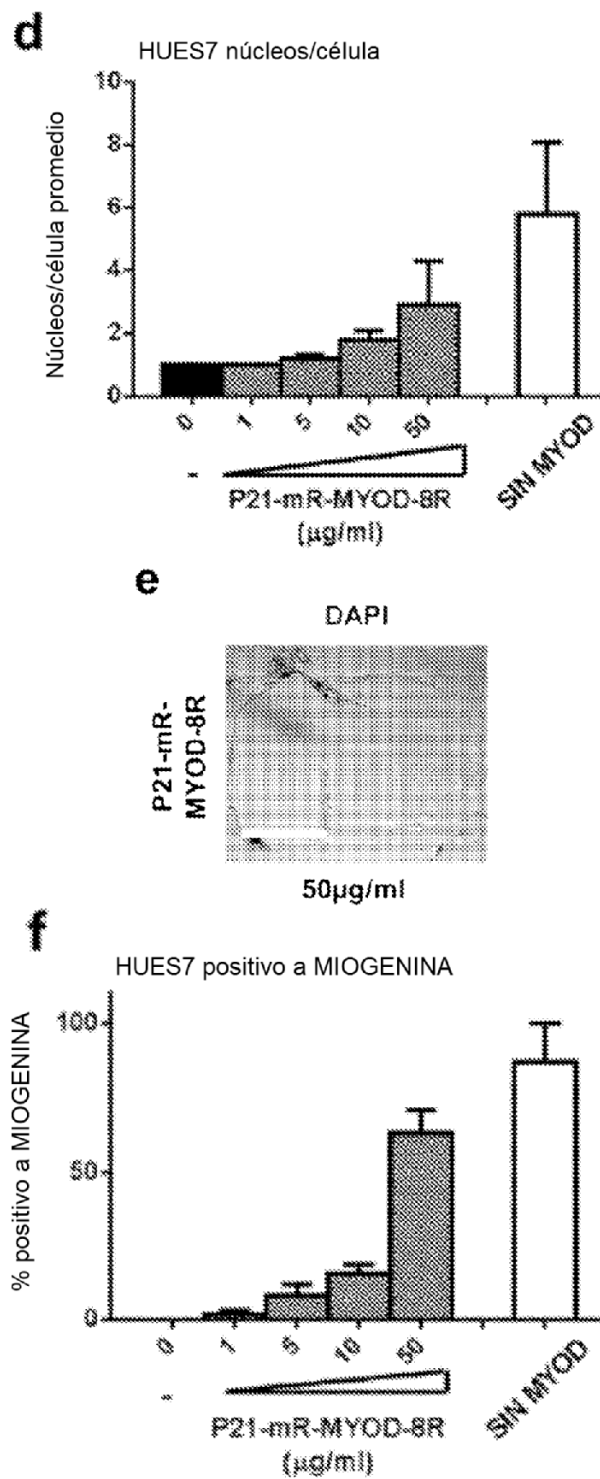


Figura 8

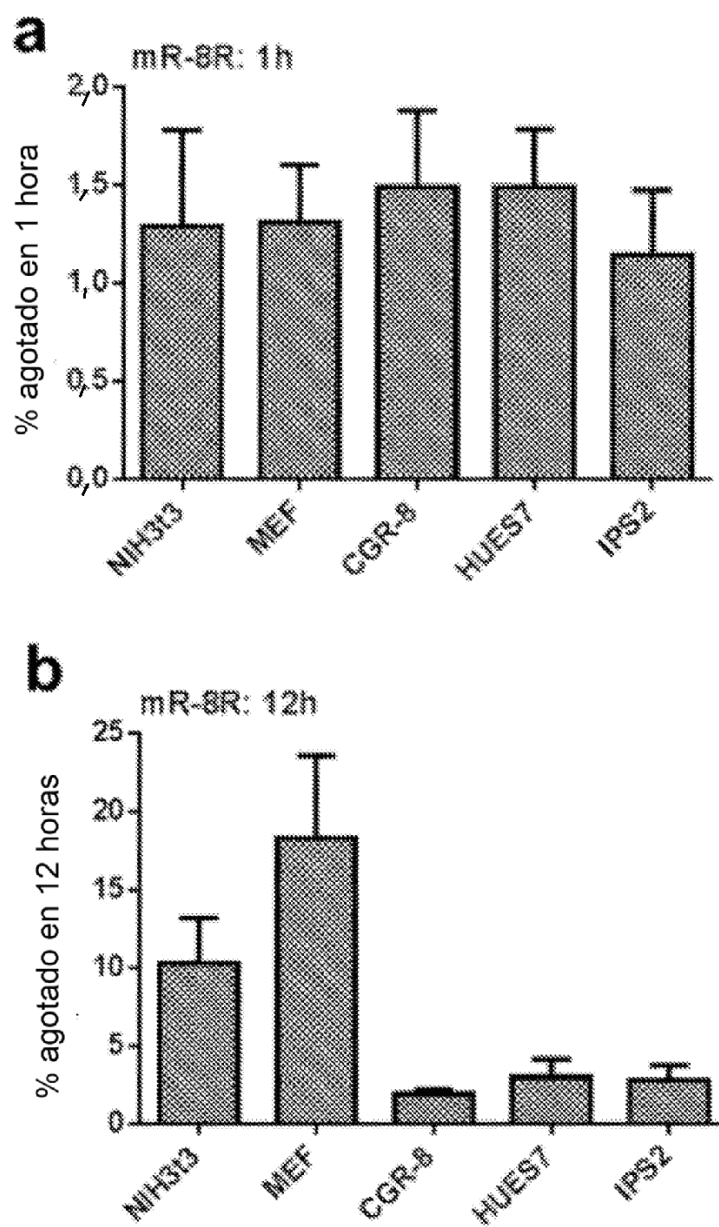


Figura 9

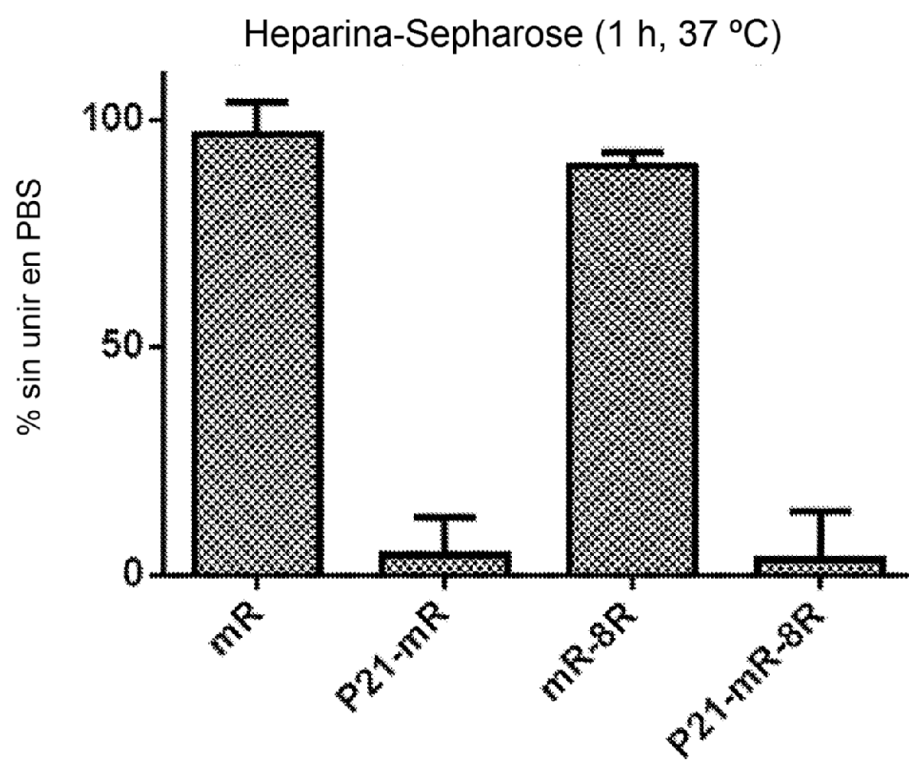
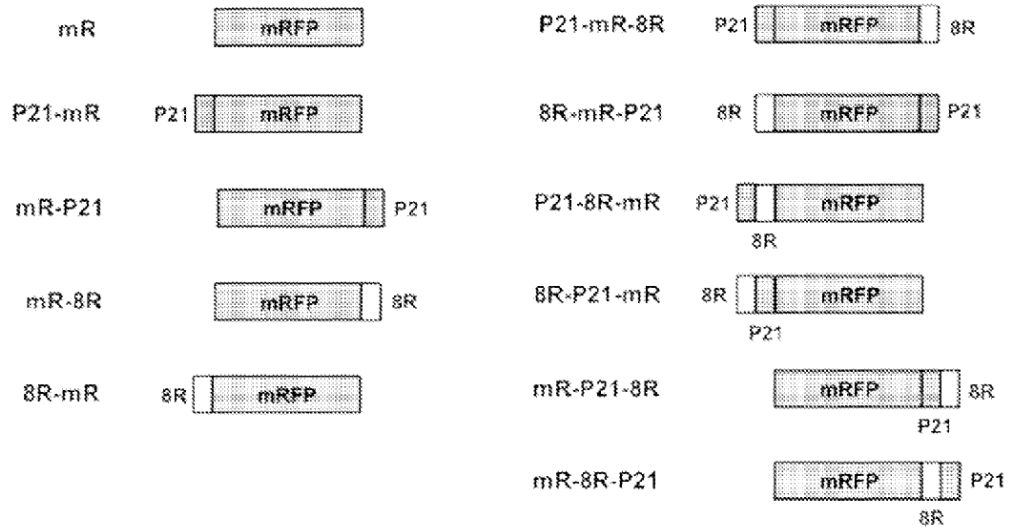


Figura 10

a



b

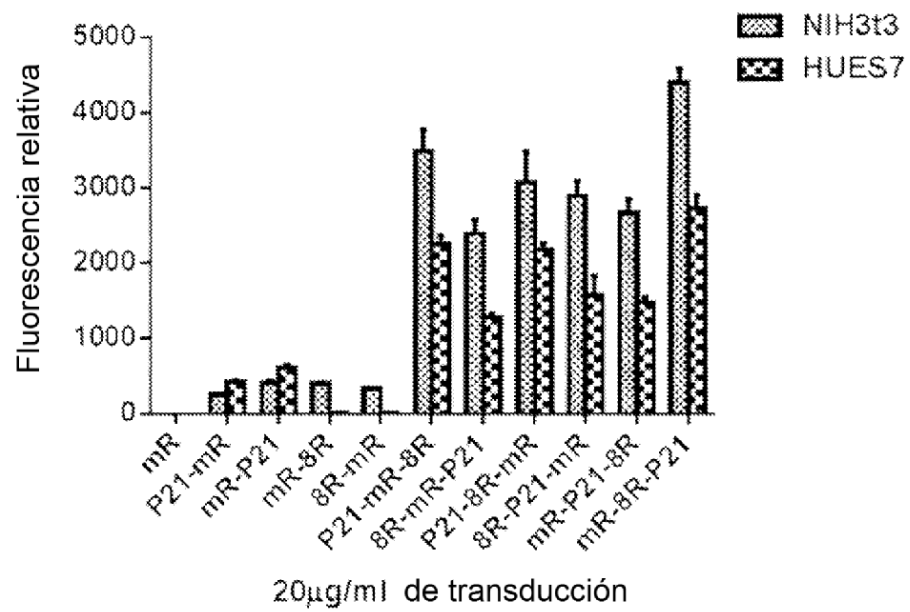
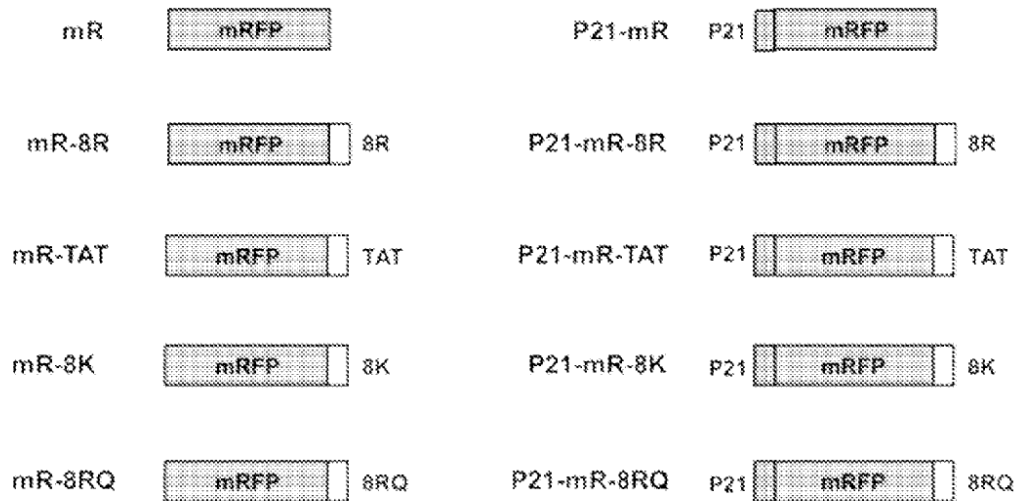


Figura 11

a



b

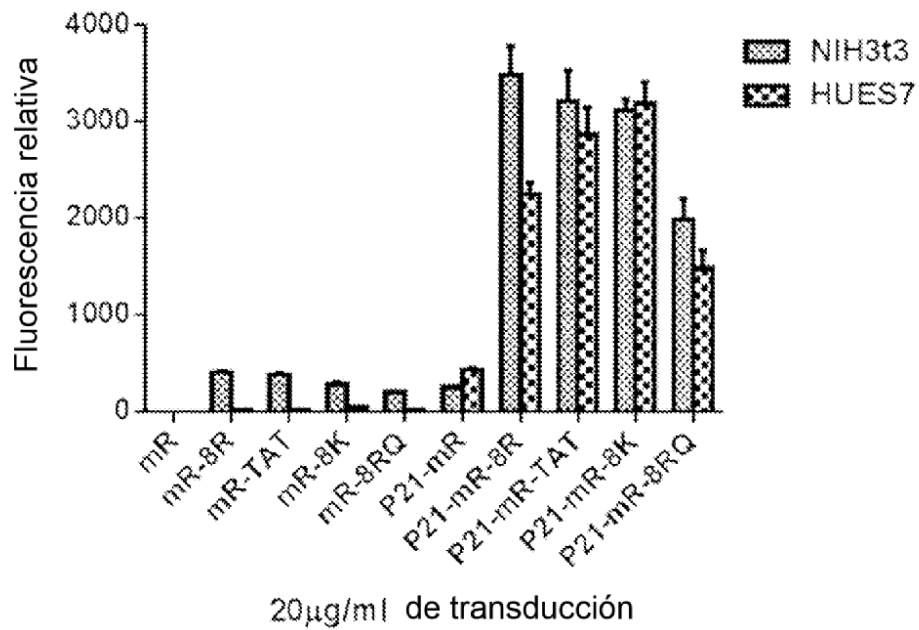


Figura 12

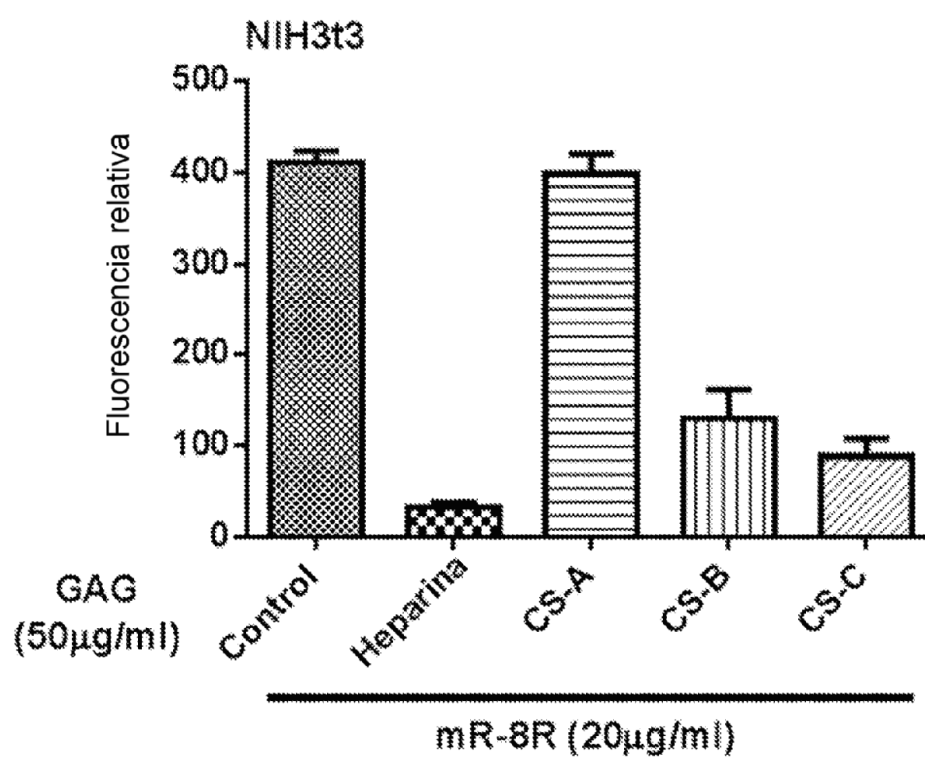


Figura 13

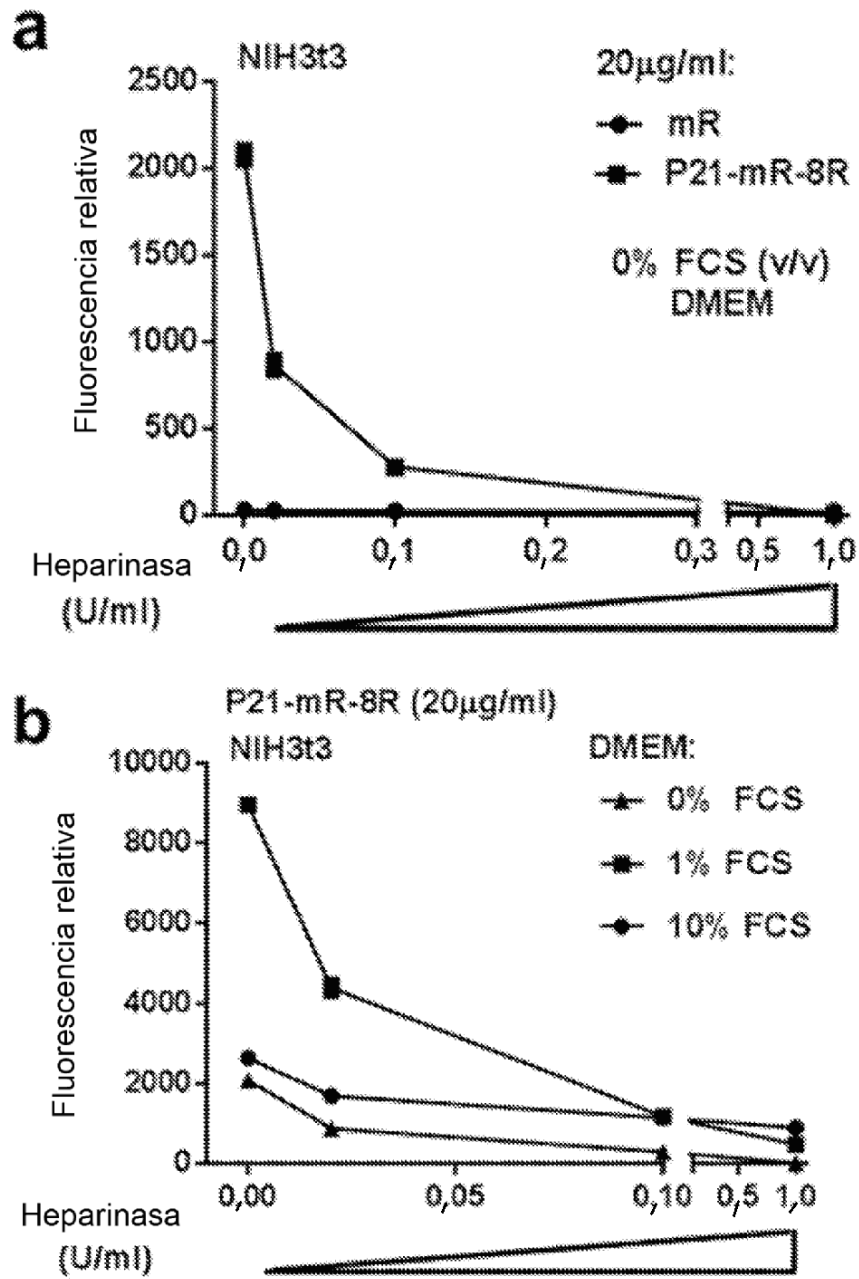


Figura 13

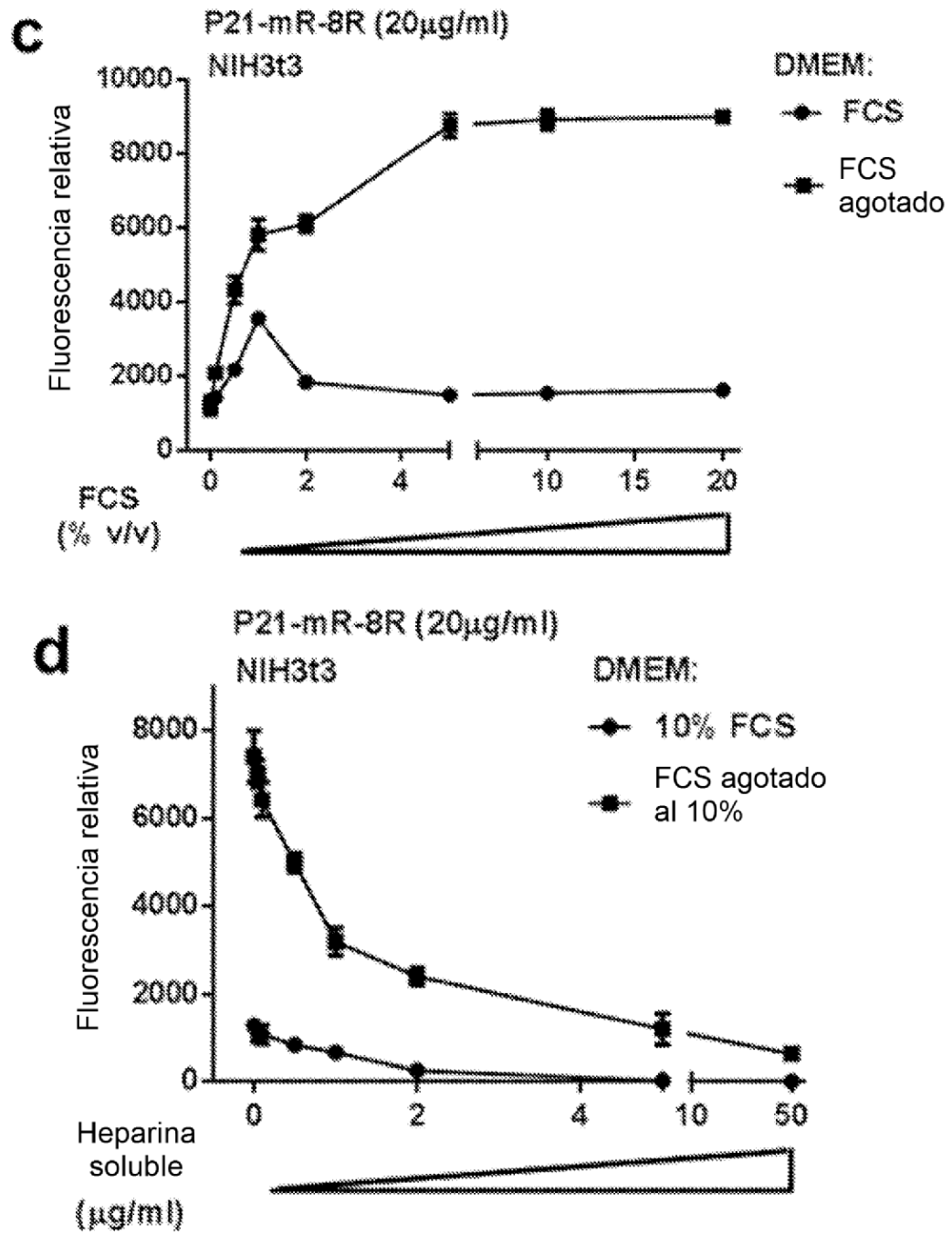


Figura 14

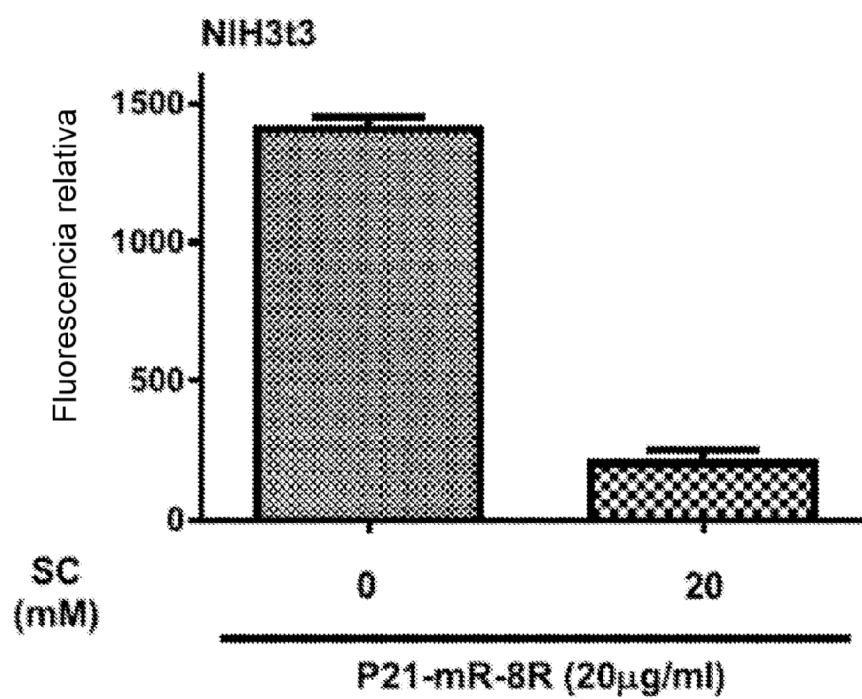


Figura 15

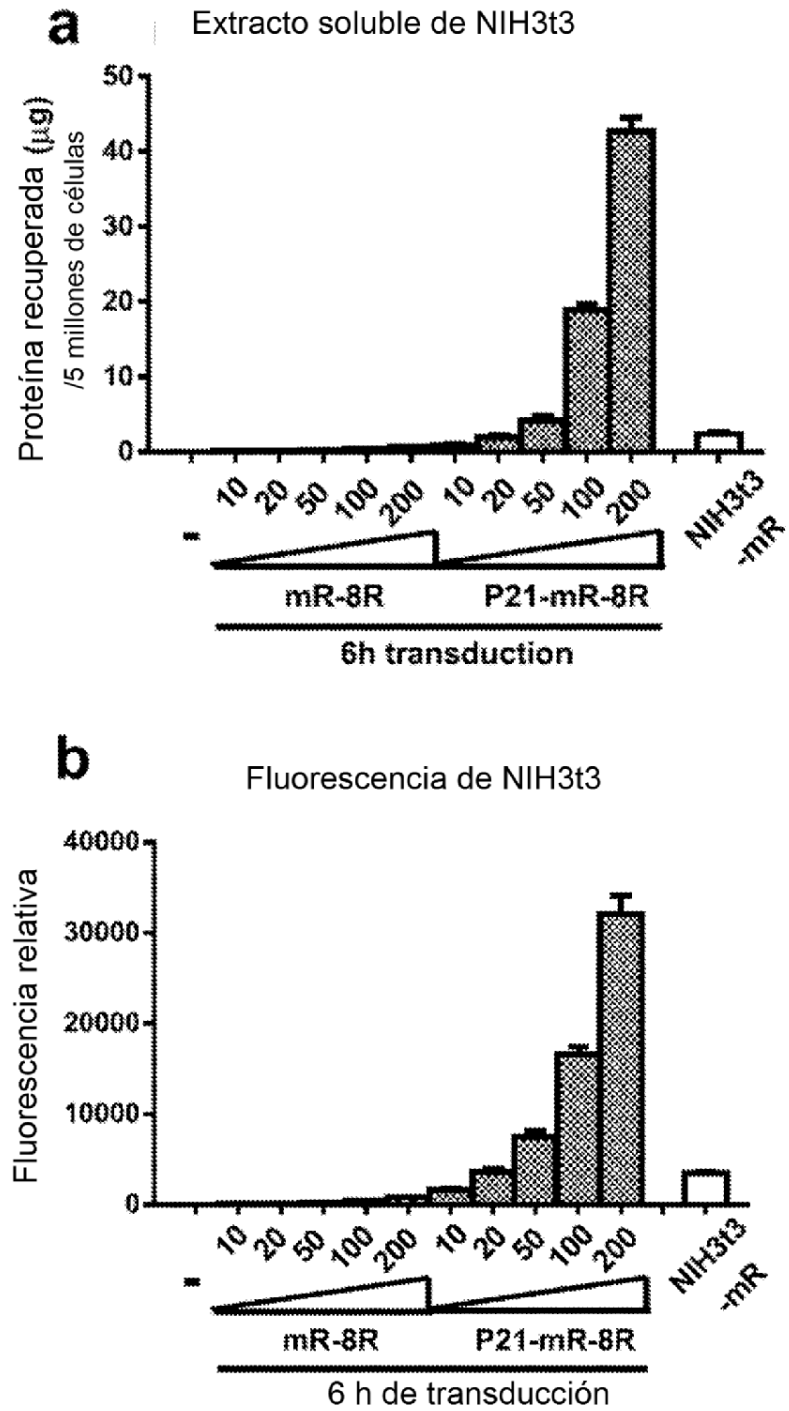


Figura 16

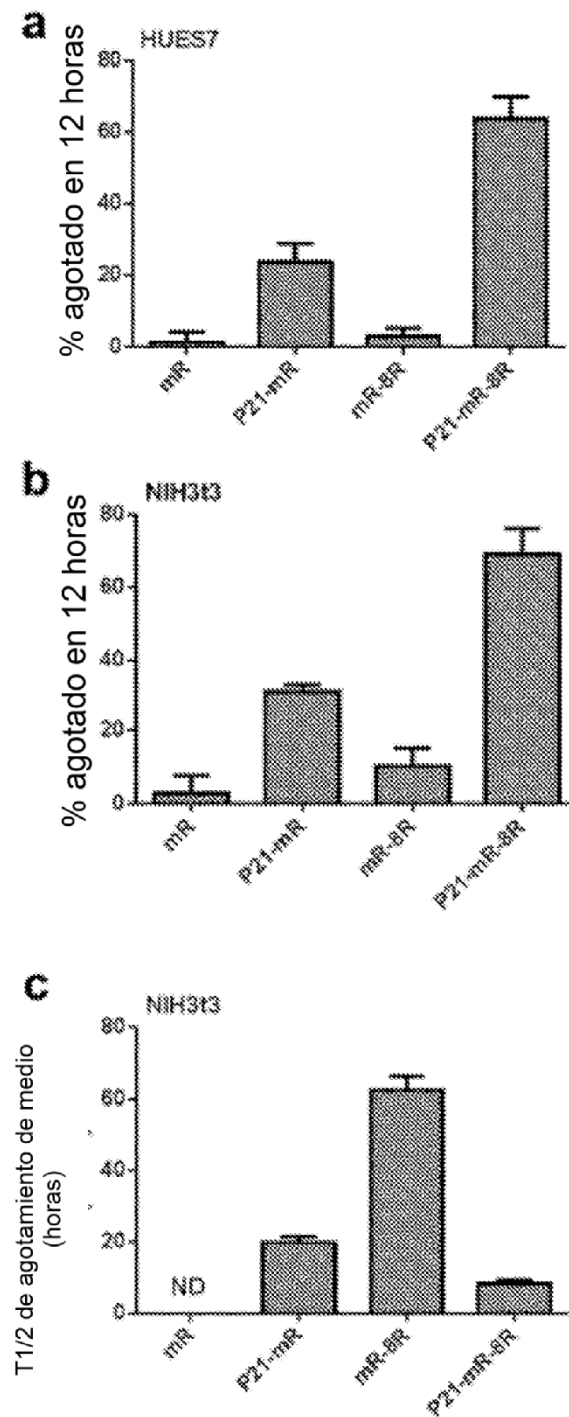


Figura 17

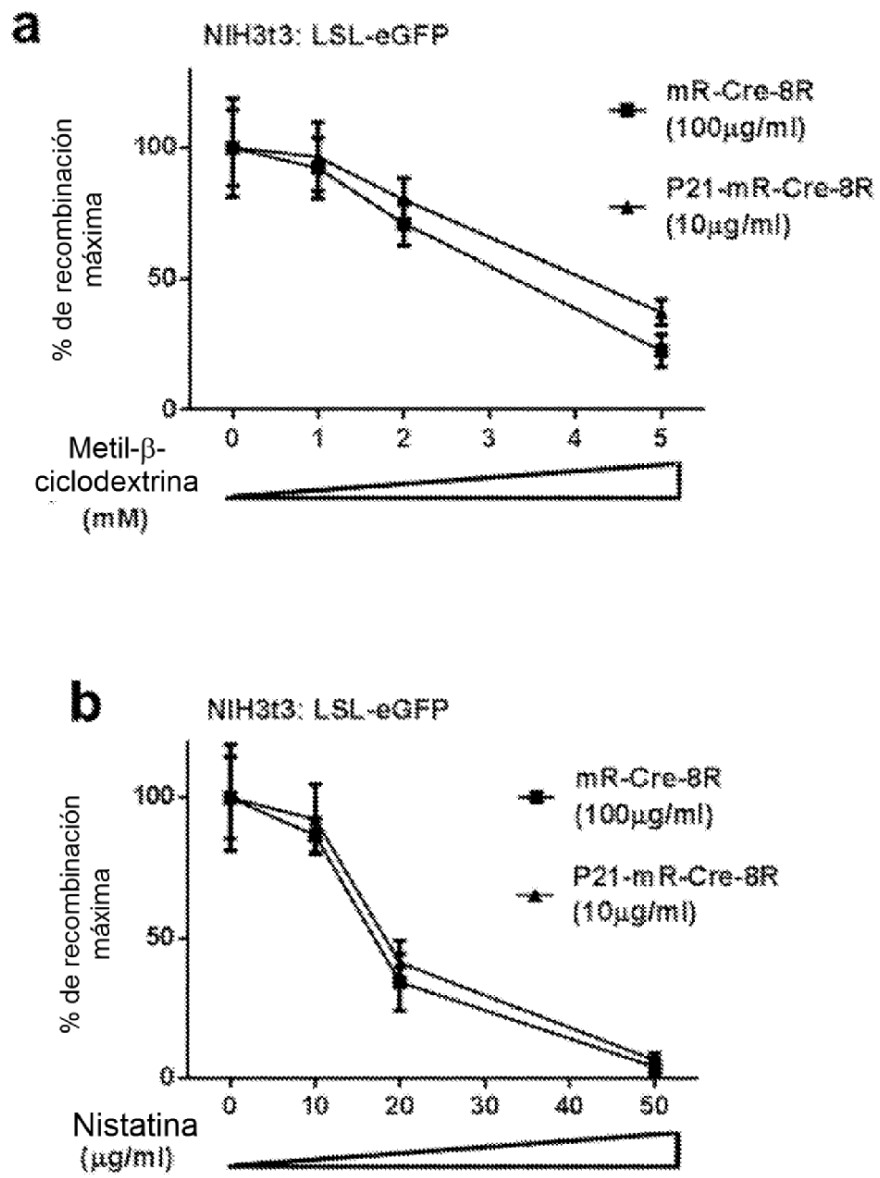


Figura 17 continuación

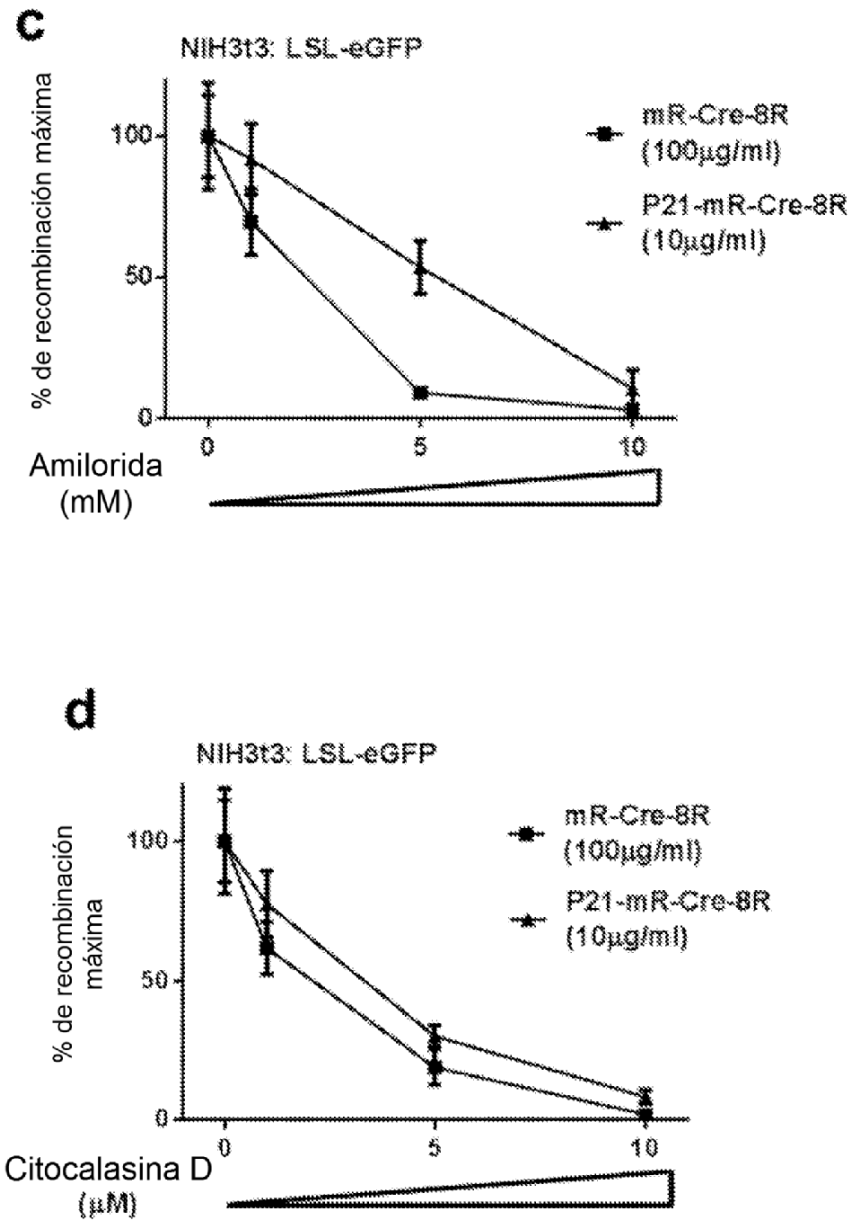


Figura 17 continuación

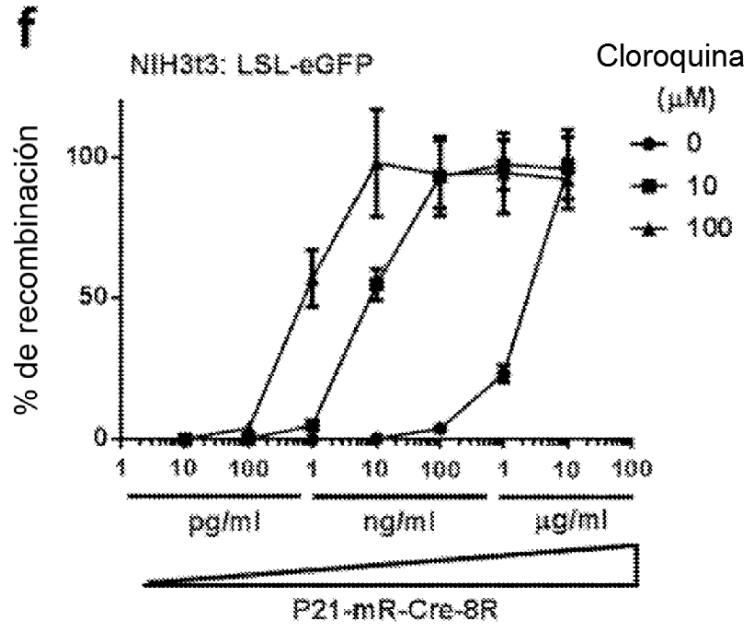
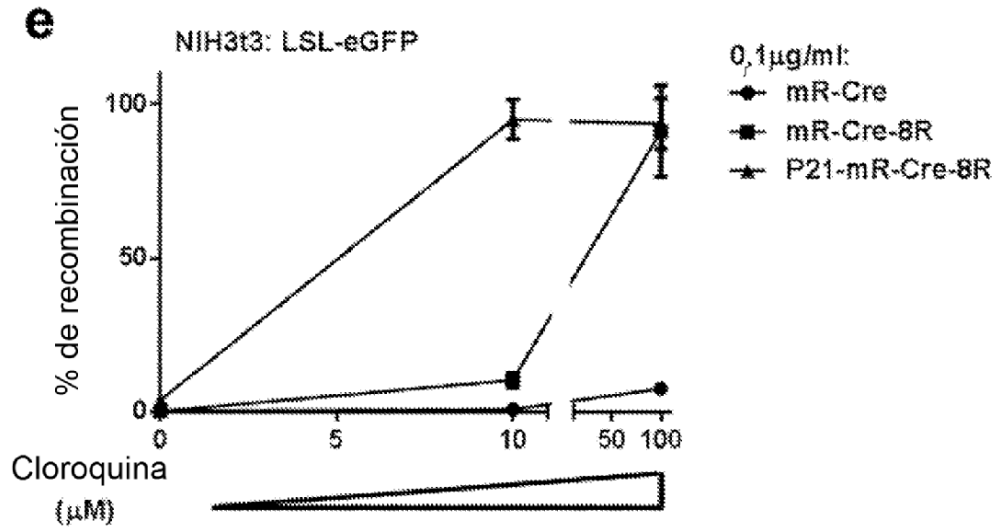


Figura 18

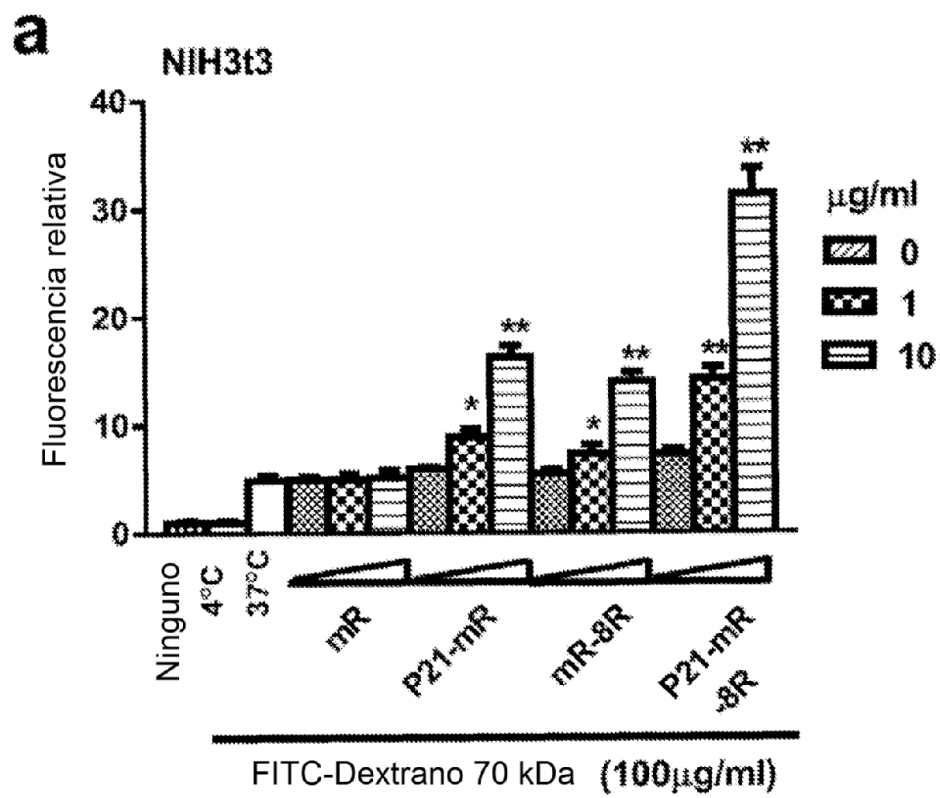


Figura 19

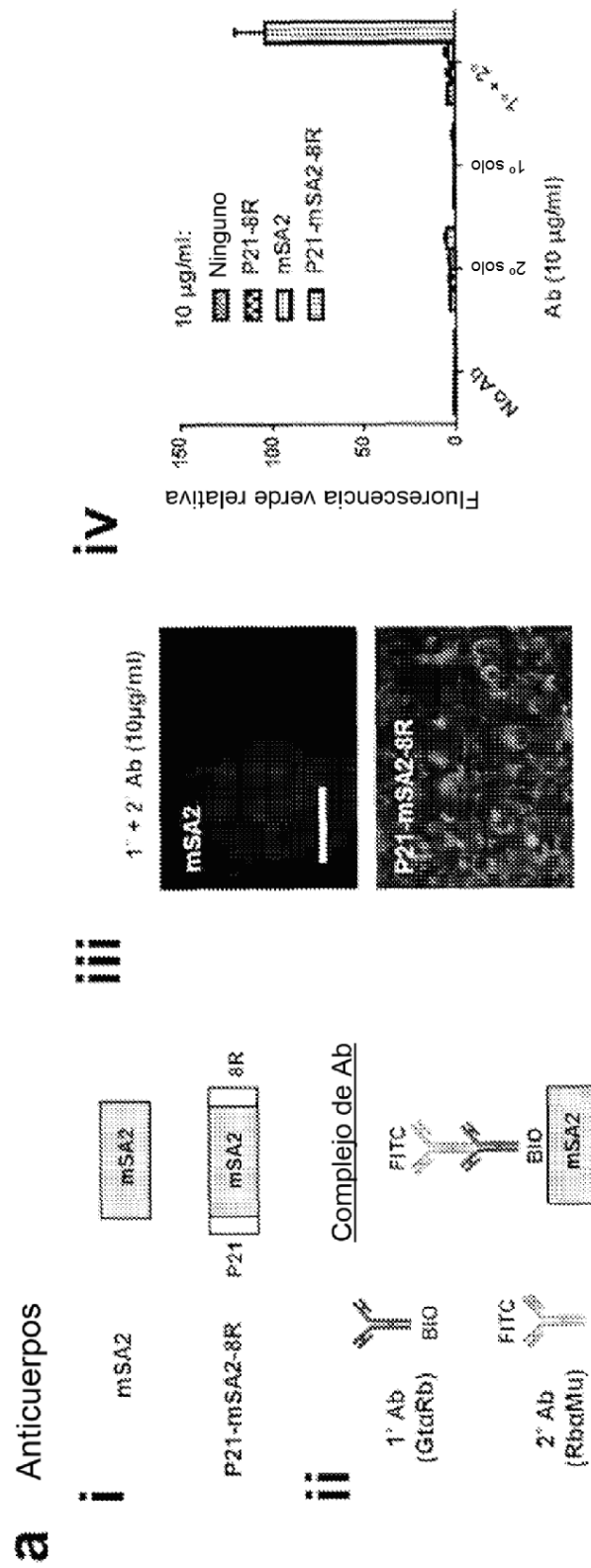


Figura 19 continuación

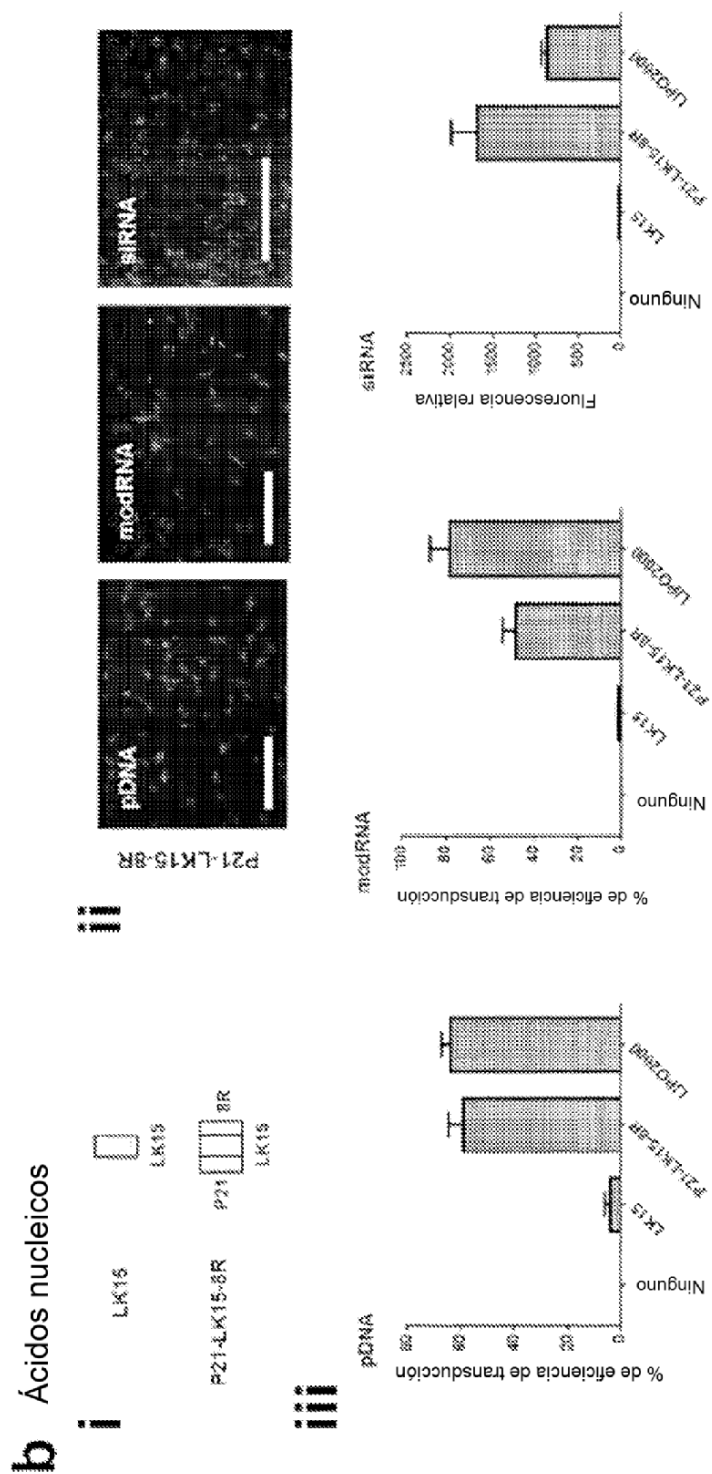


Figura 19 continuación

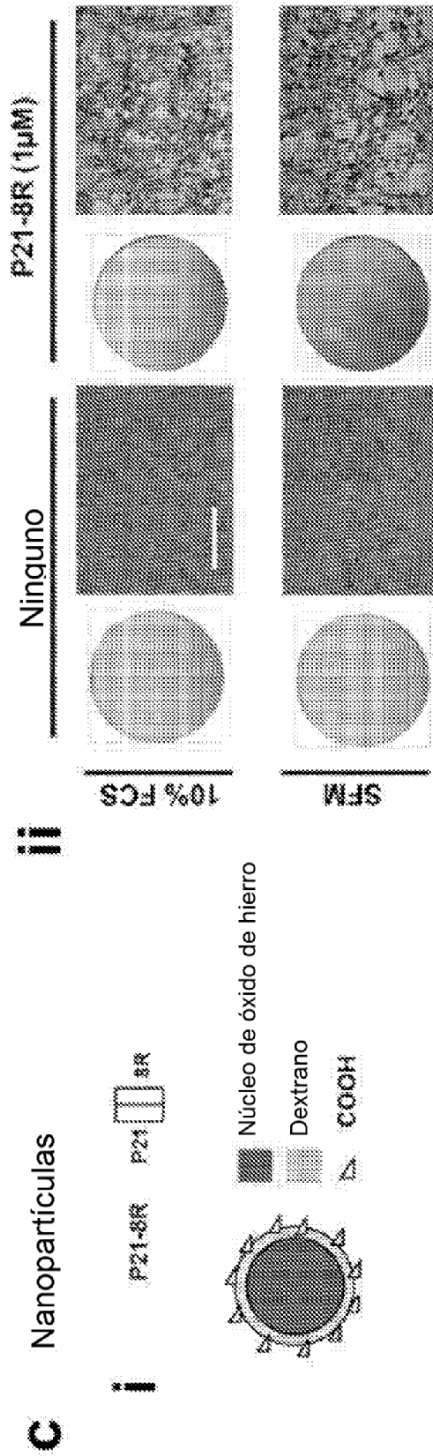


Figura 20

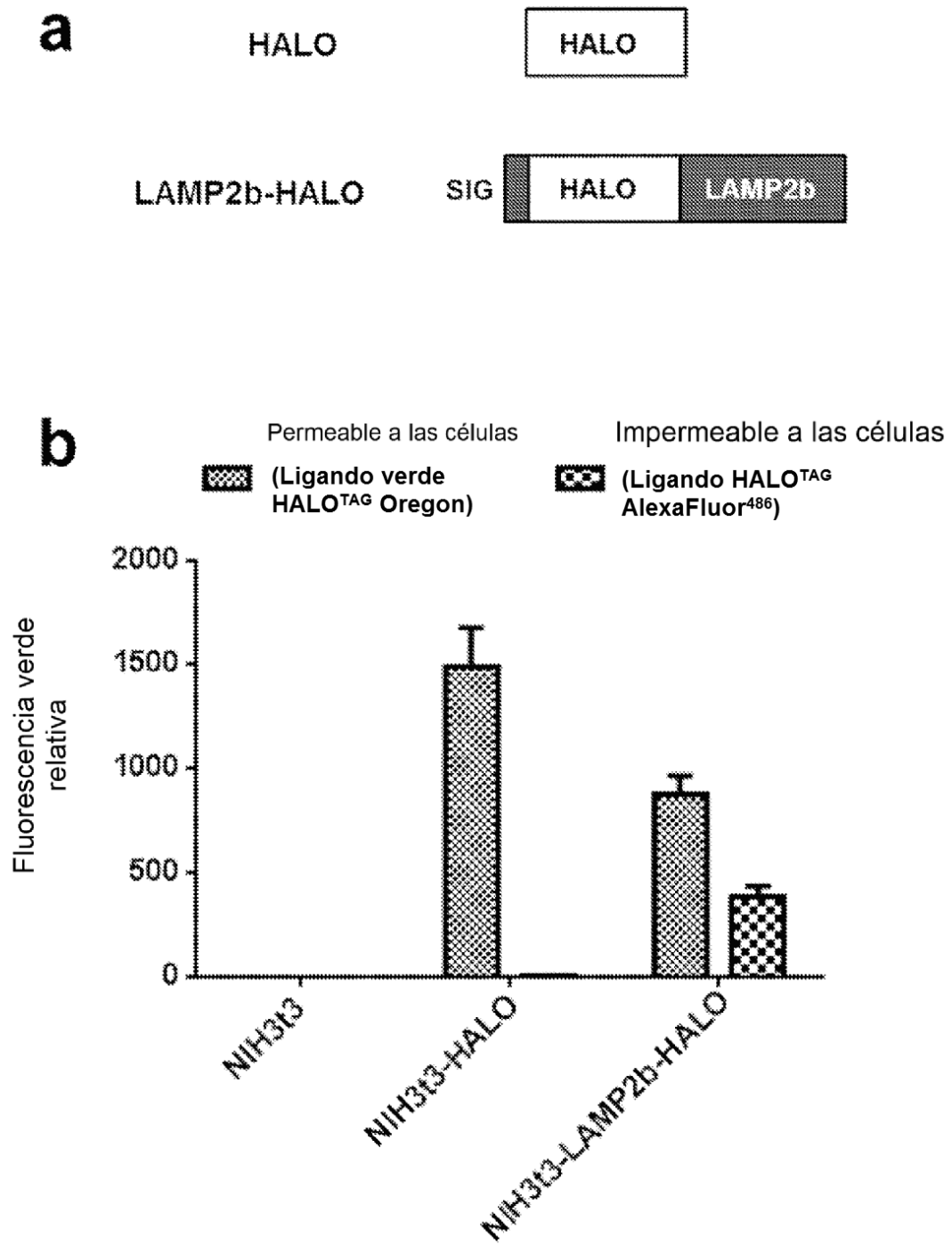


Figura 21

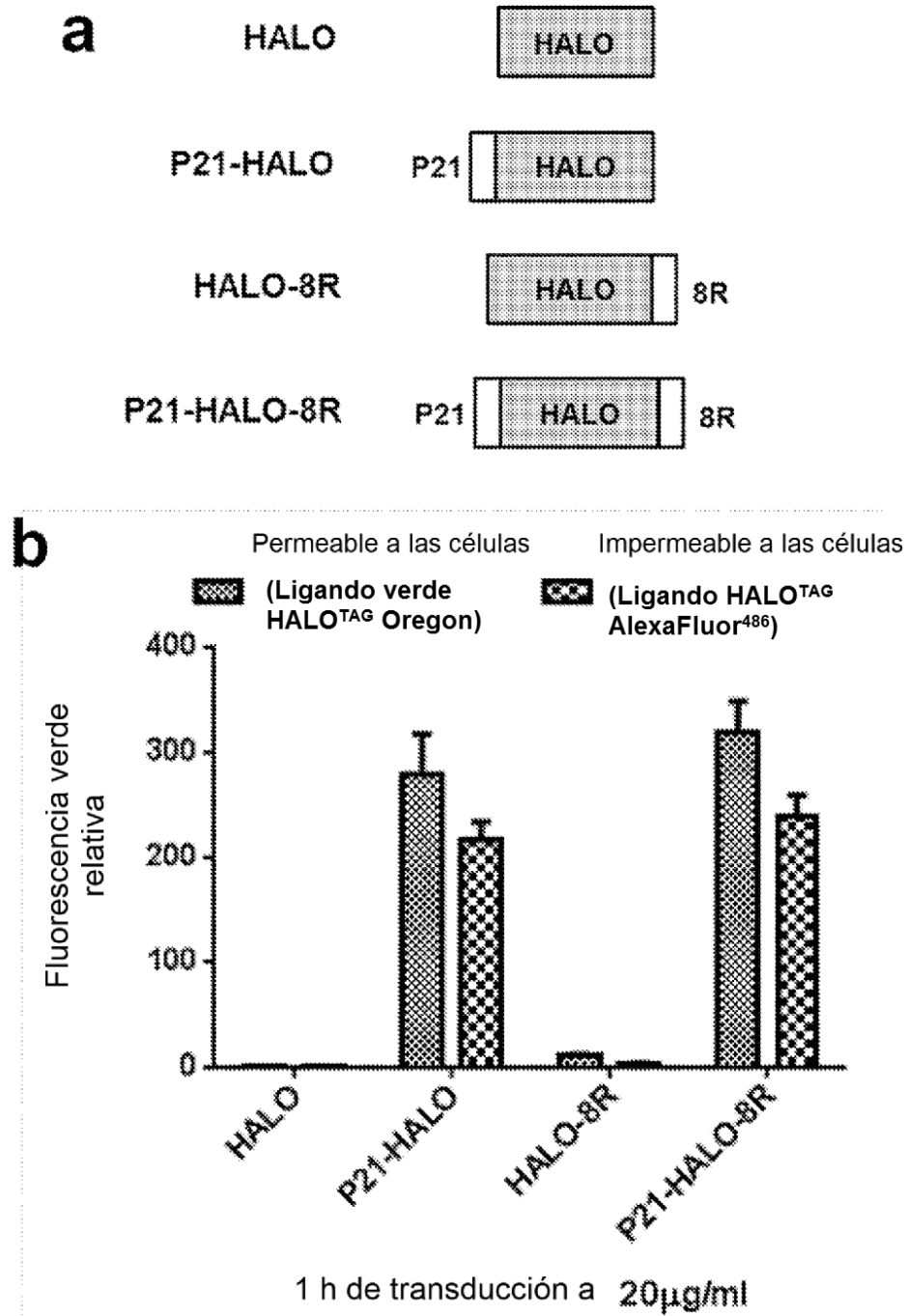


Figura 21 continuación

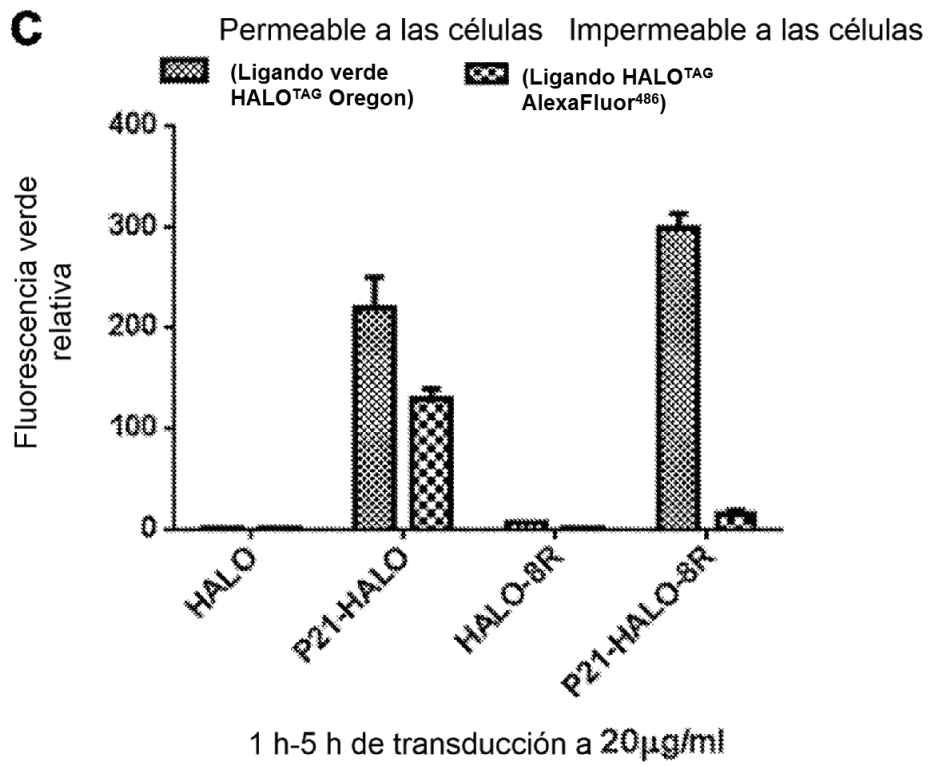


Figura 22

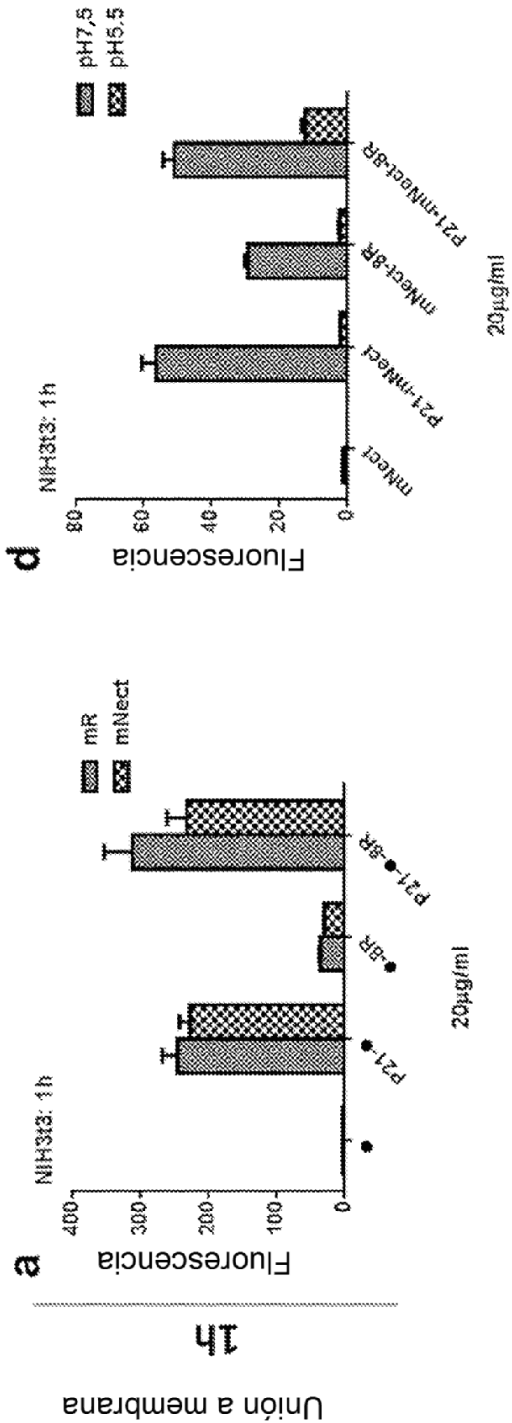


Figura 22 continuación

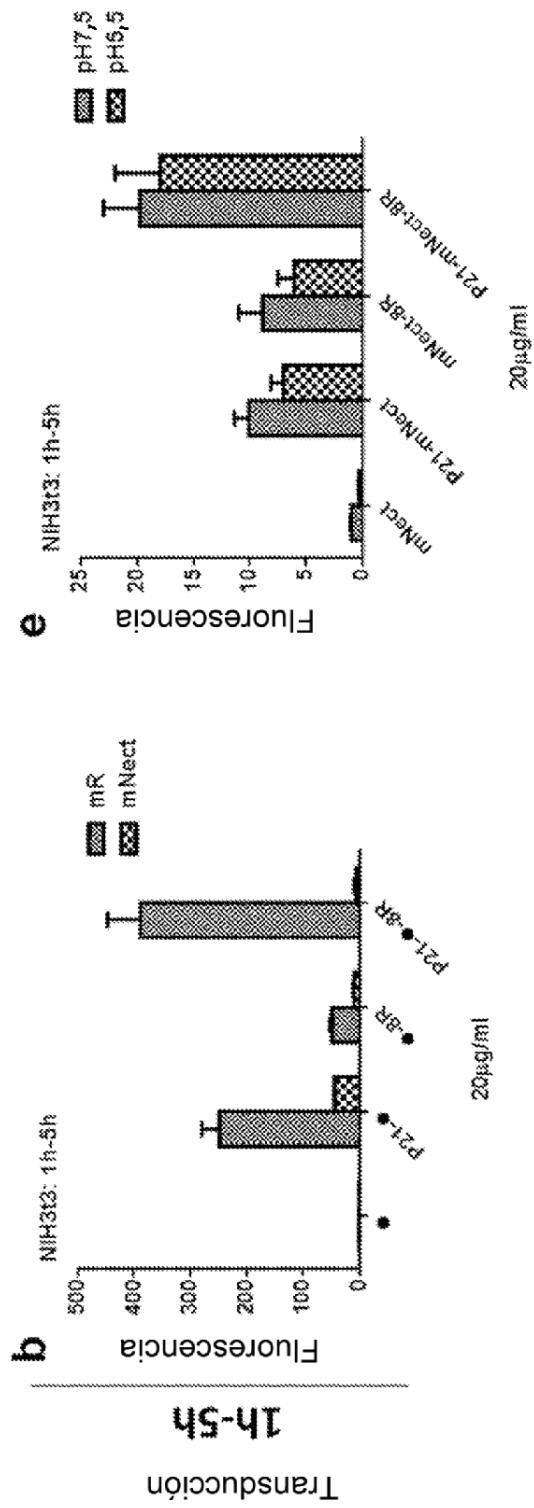


Figura 22 continuación

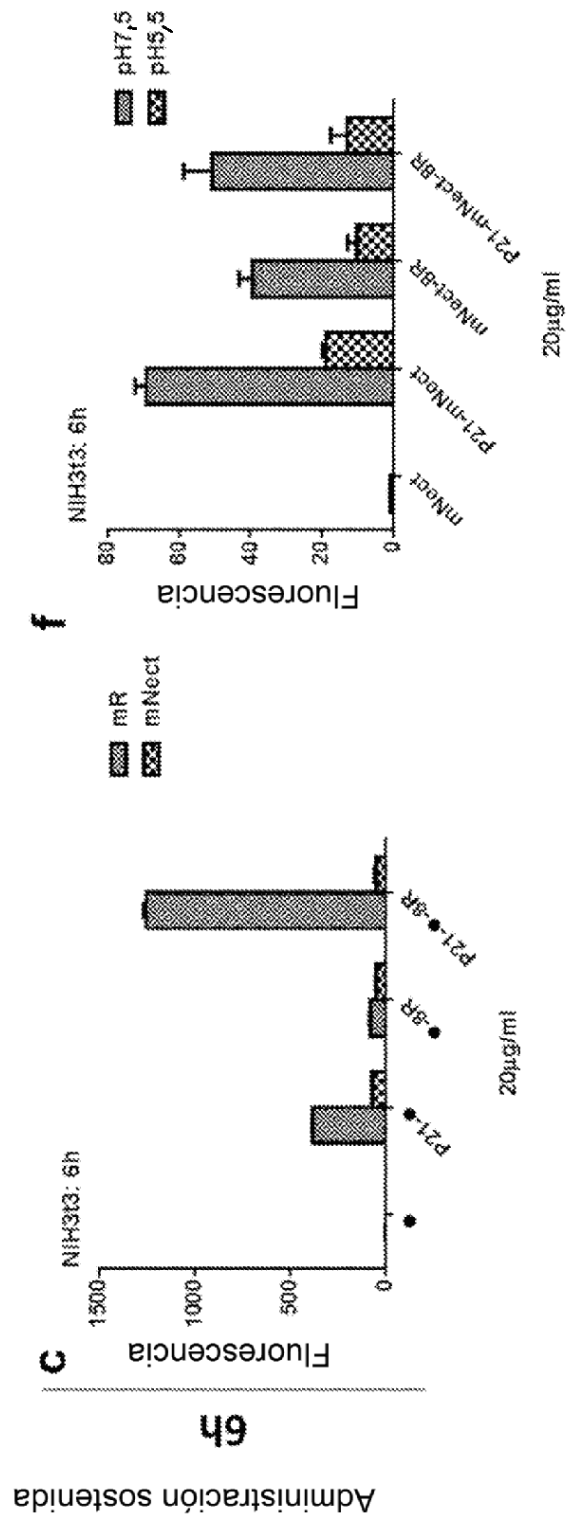


Figura 23

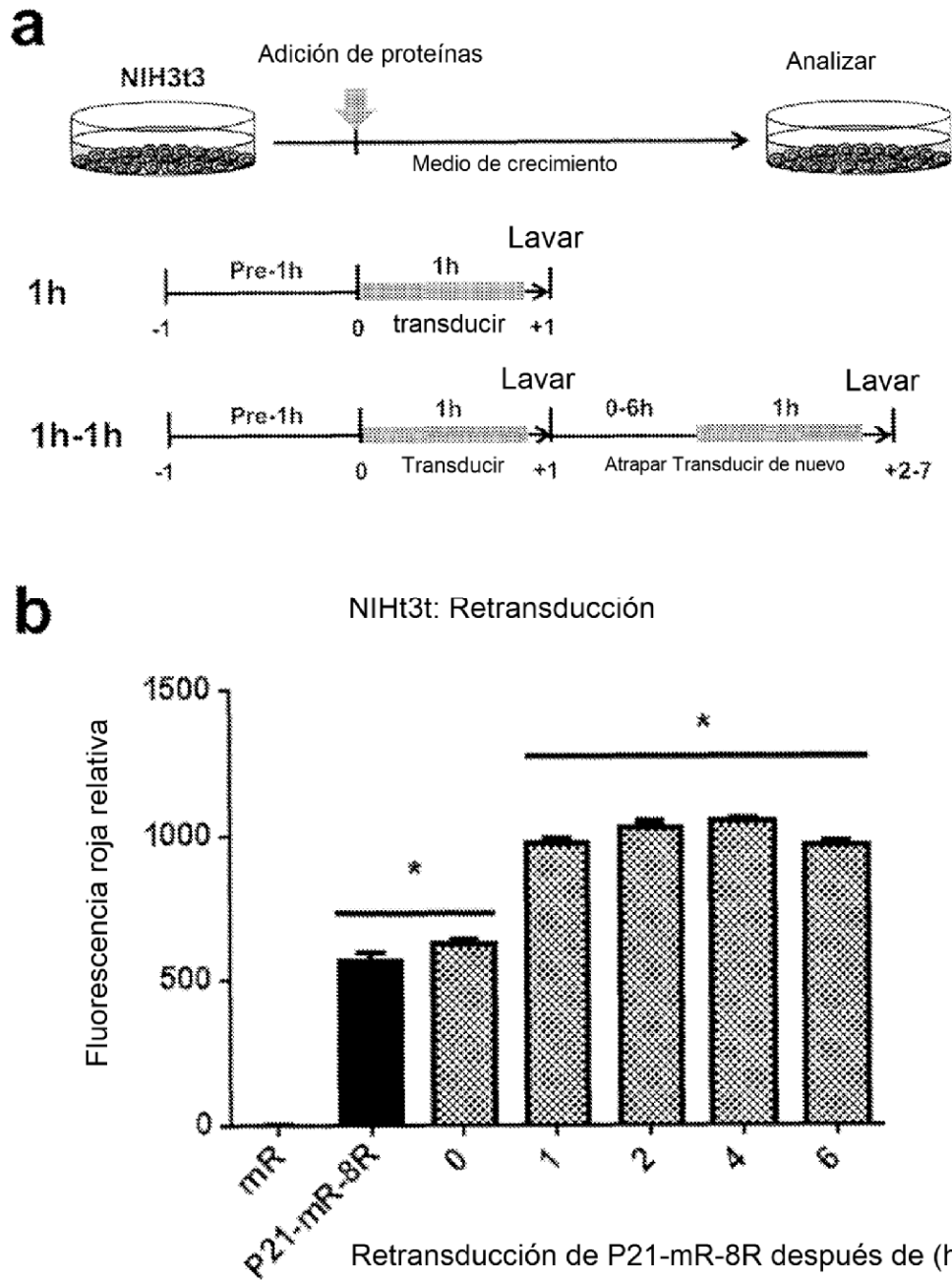


Figura 24

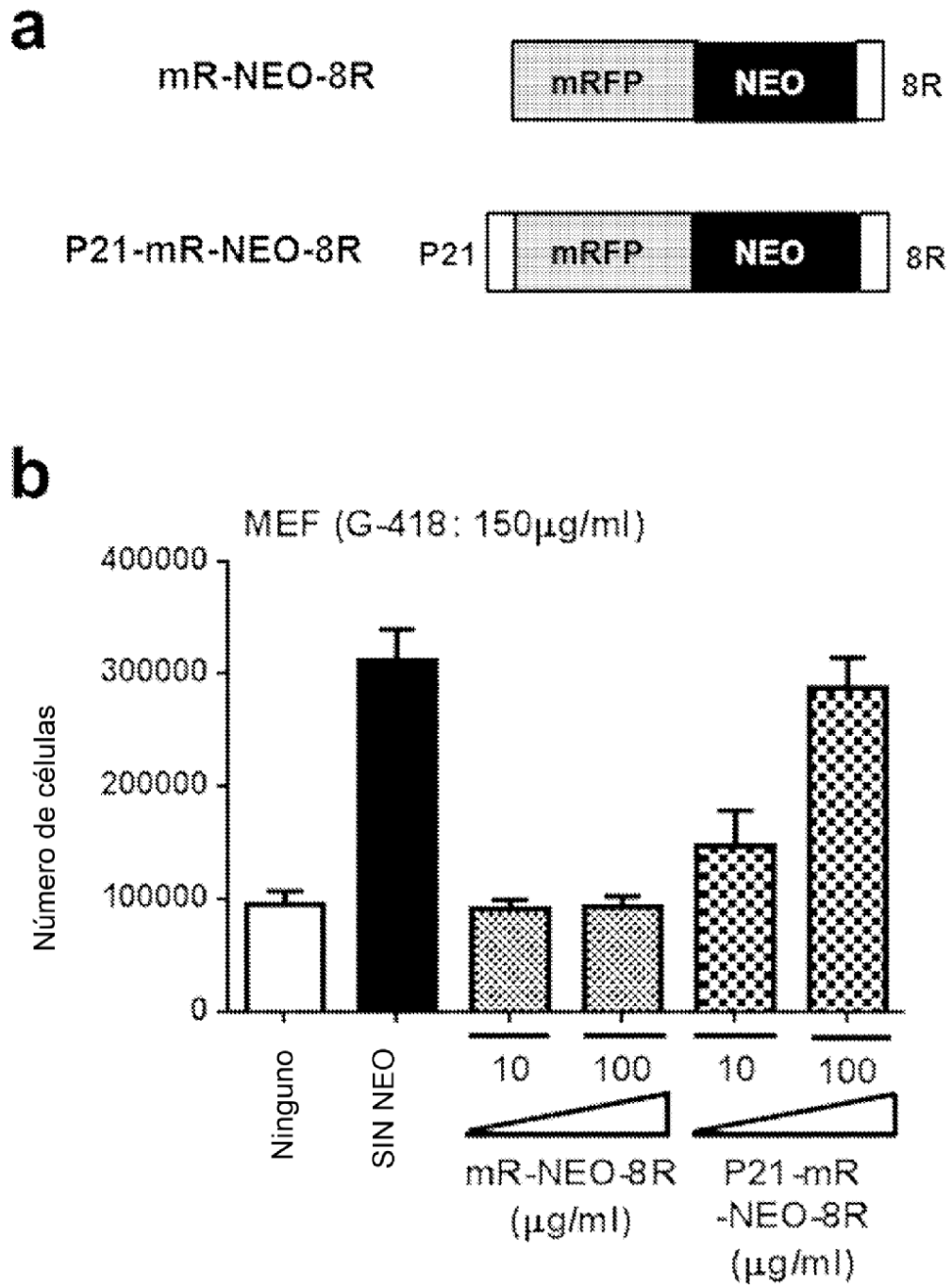


Figura 25

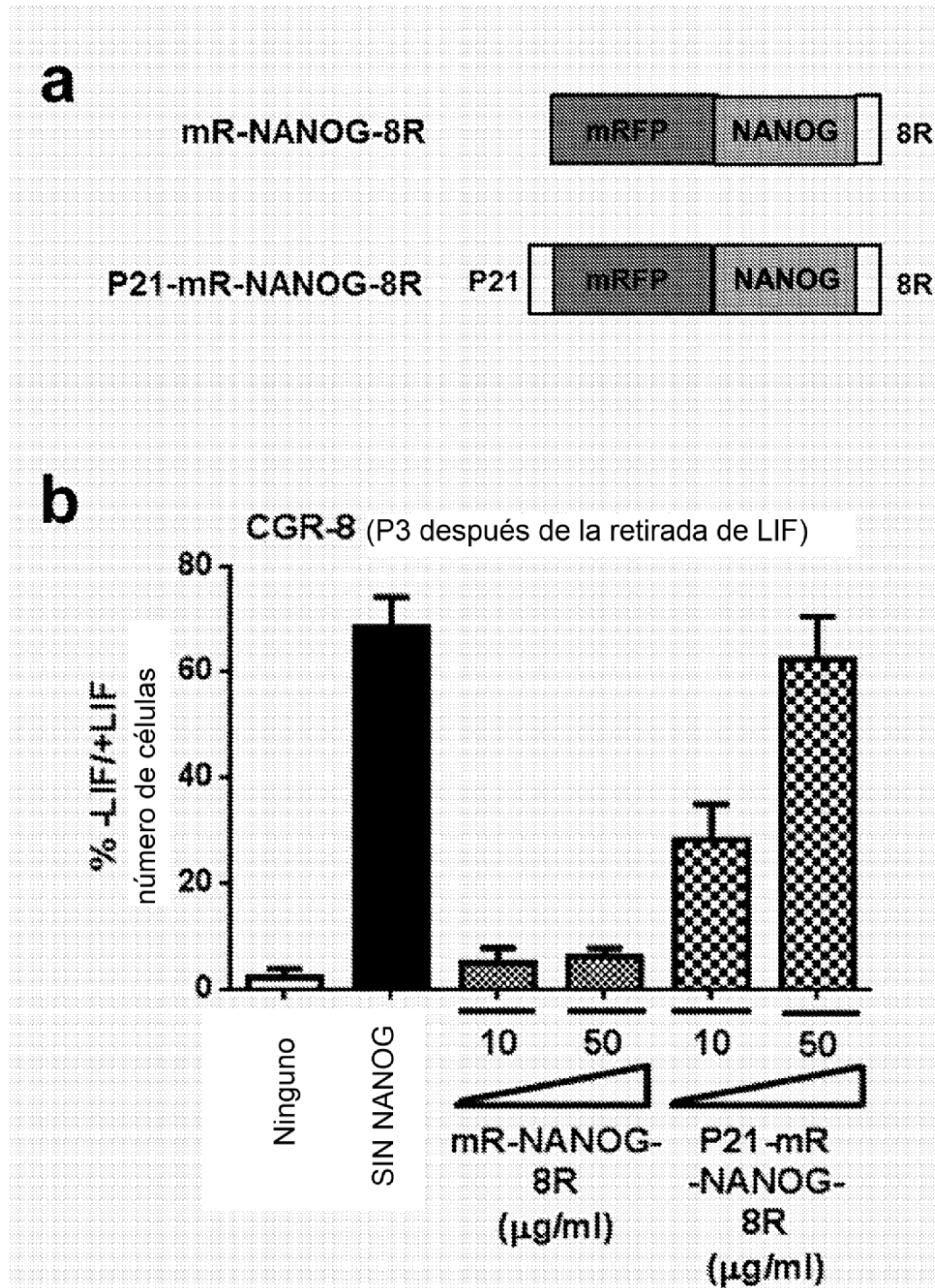


Figura 26

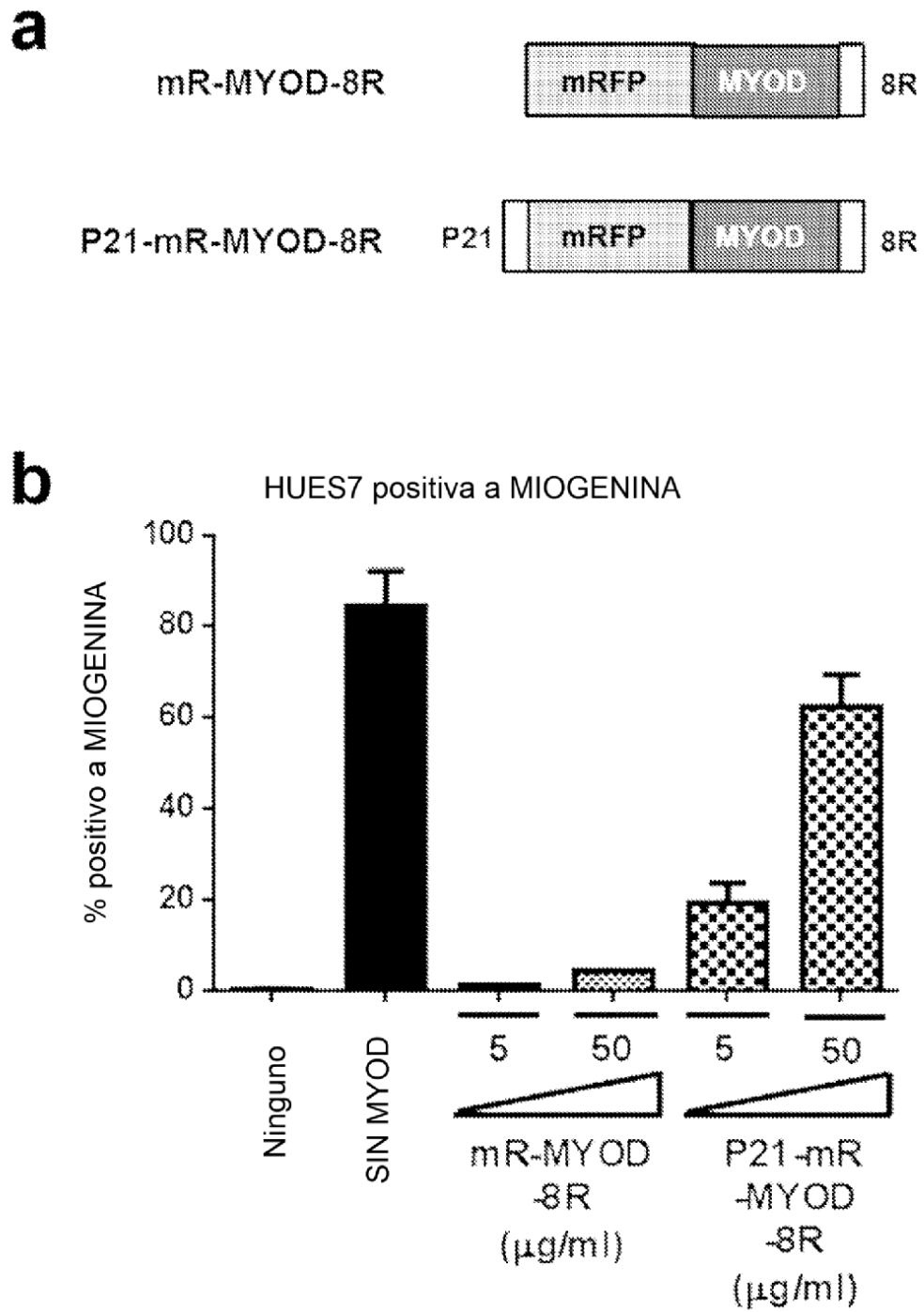


Figura 27

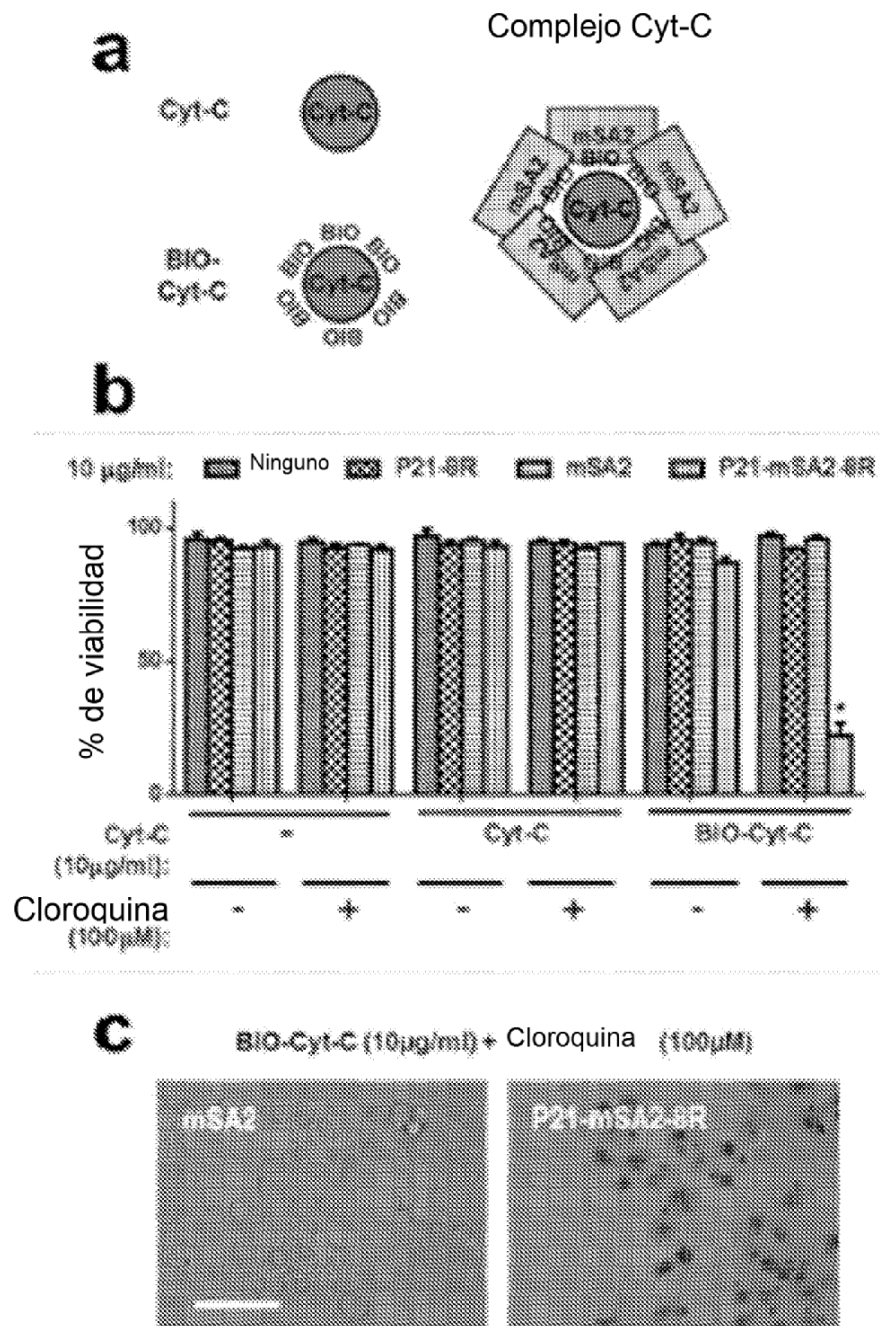


Figura 28

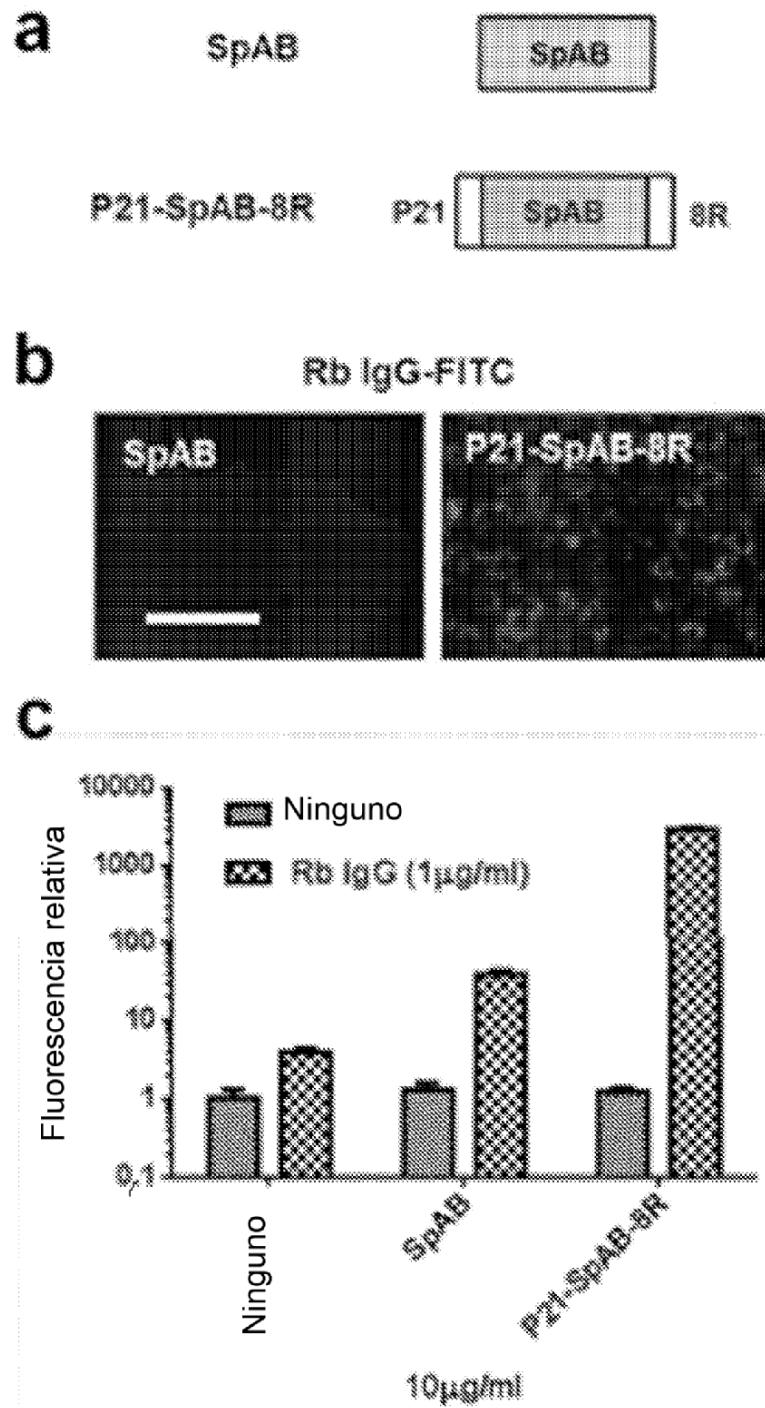


Figura 29

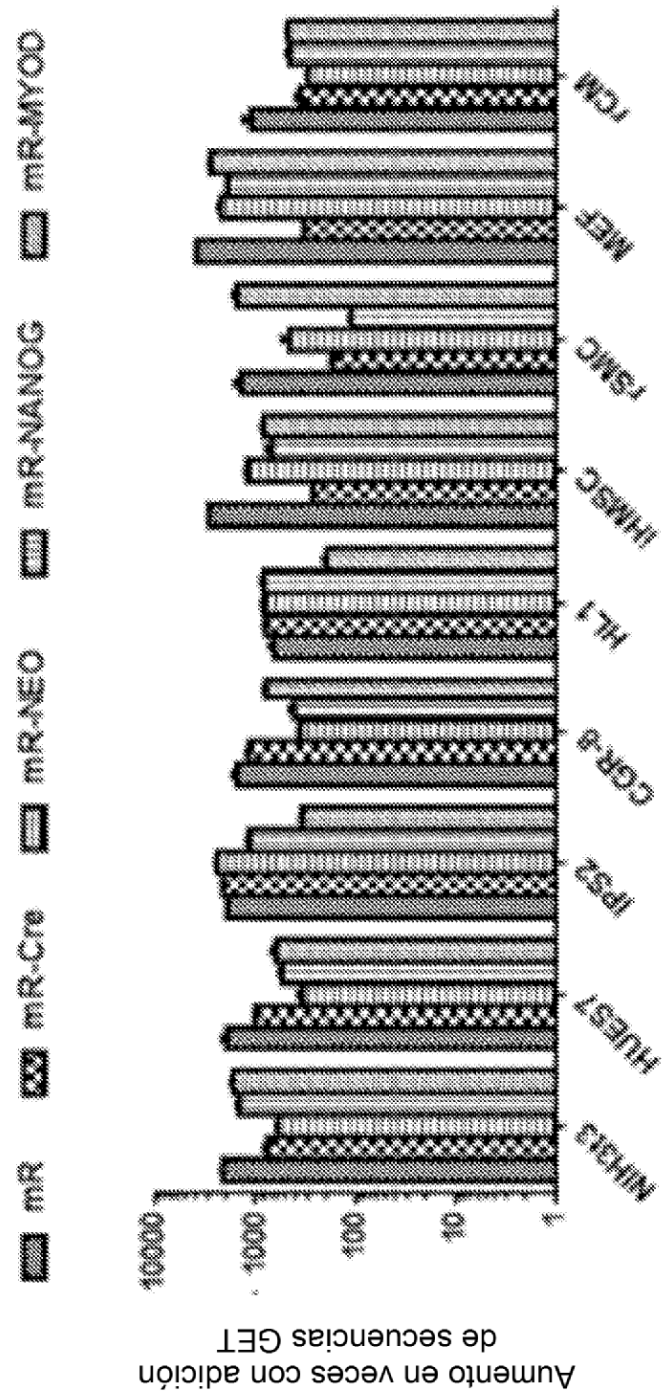


Figura 30

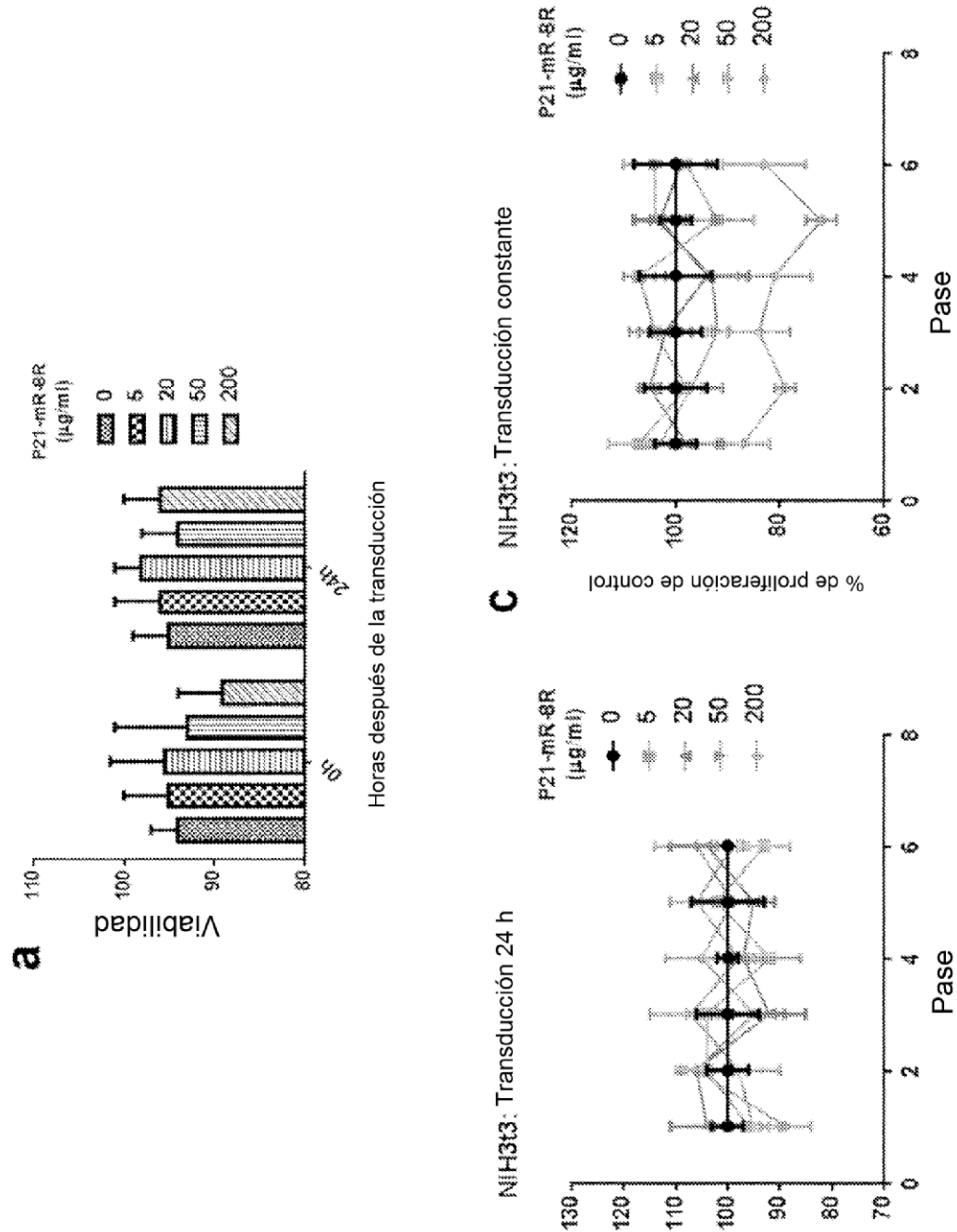


Figura 31

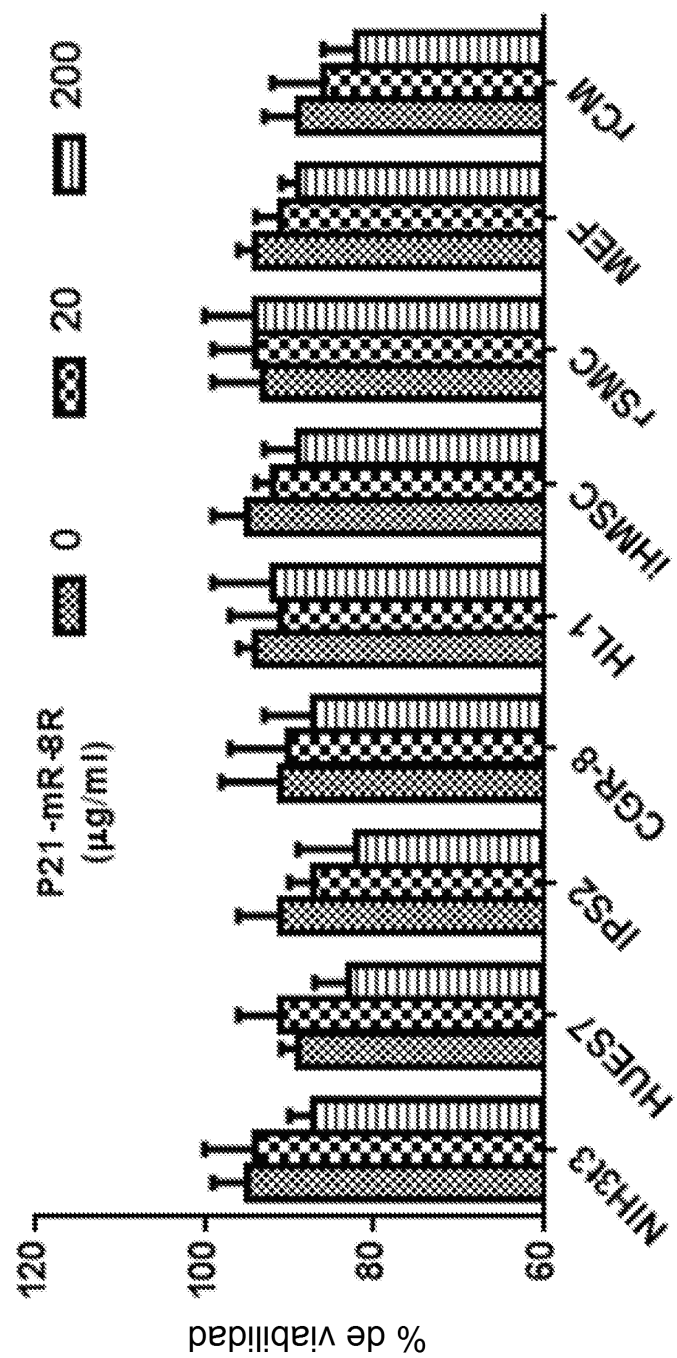


Figura 32

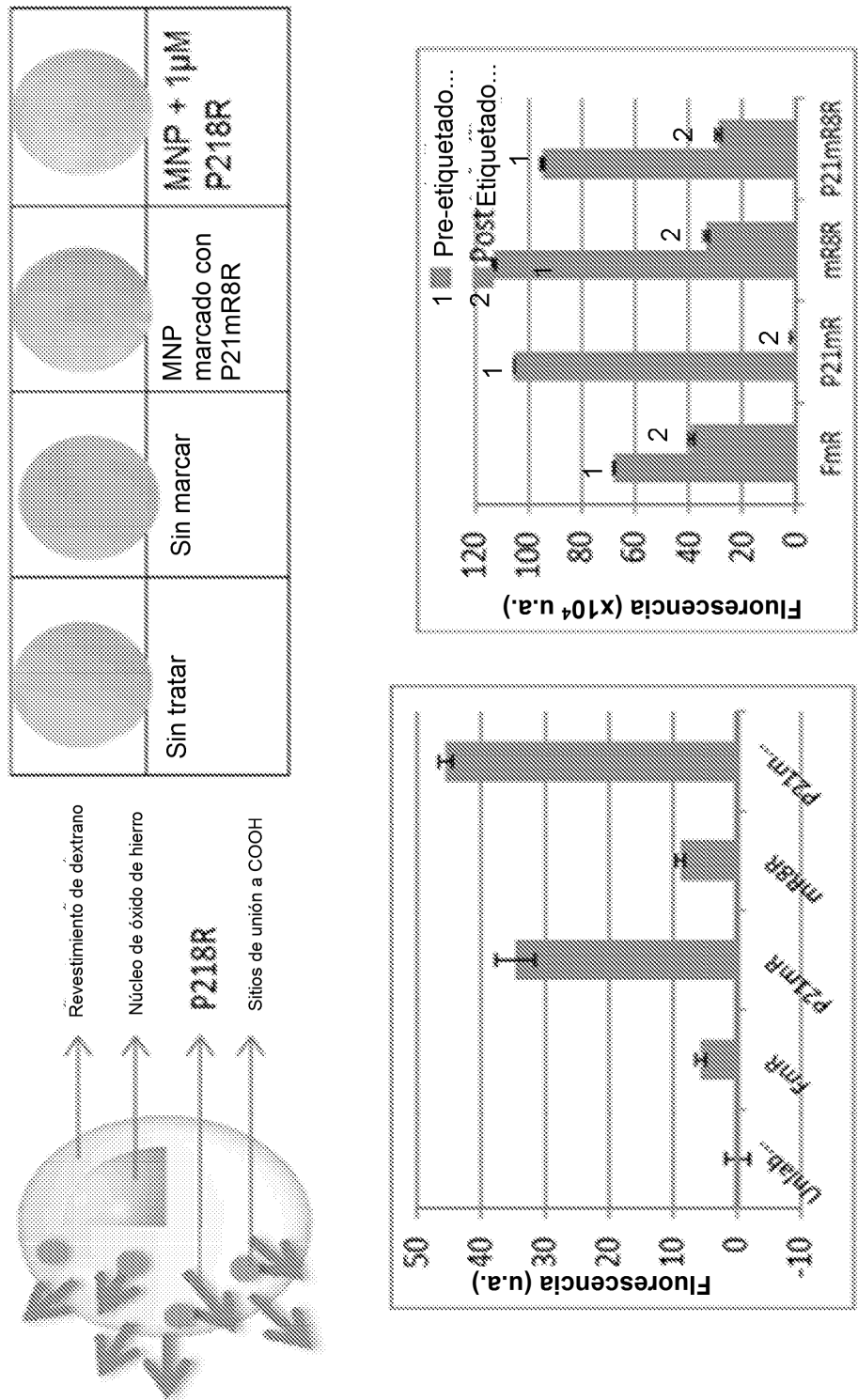


Figura 33

NIH 3t3: Incubado durante 24 horas con 50 µg de Nanomag-D (250 nm)									
Conc. peptídica (µg/ml)	0	0,01	0,05	0,1	0,5	1	2	5	10
P21									
8R									
P218R									

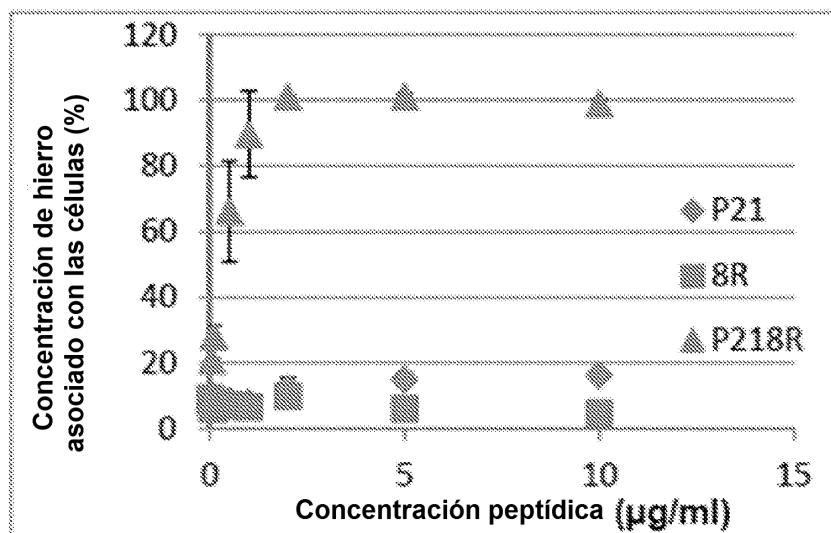


Figura 34

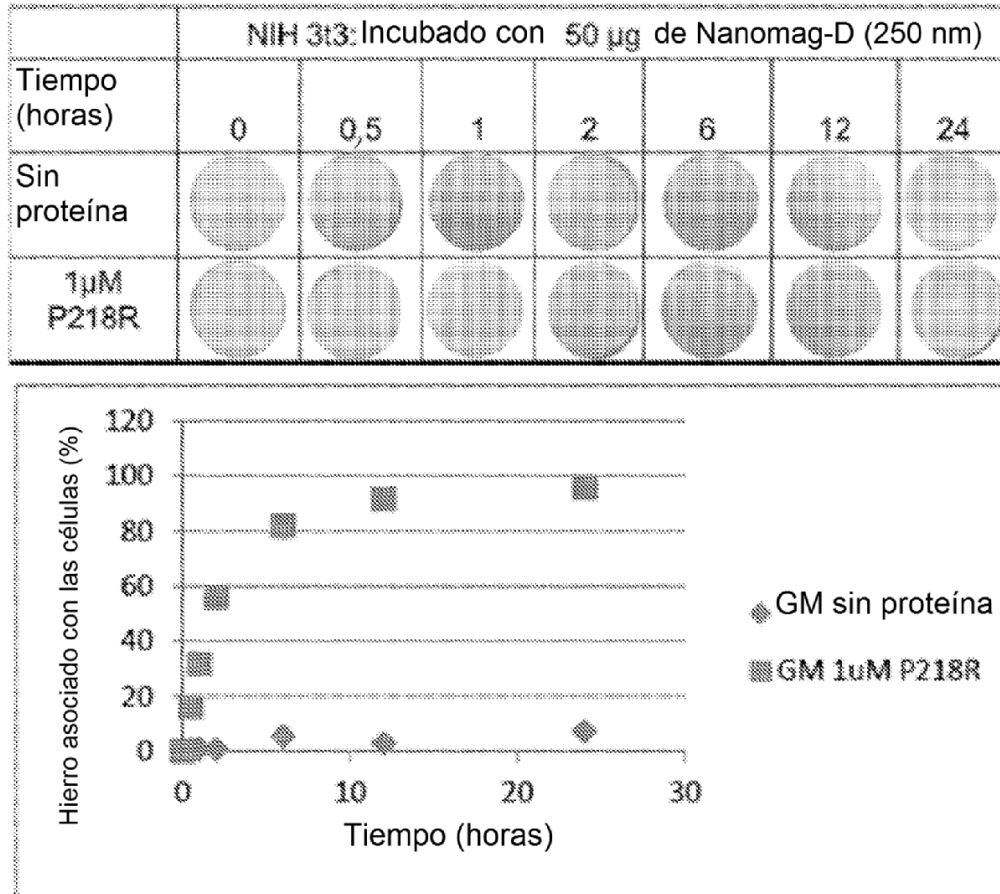


Figura 35

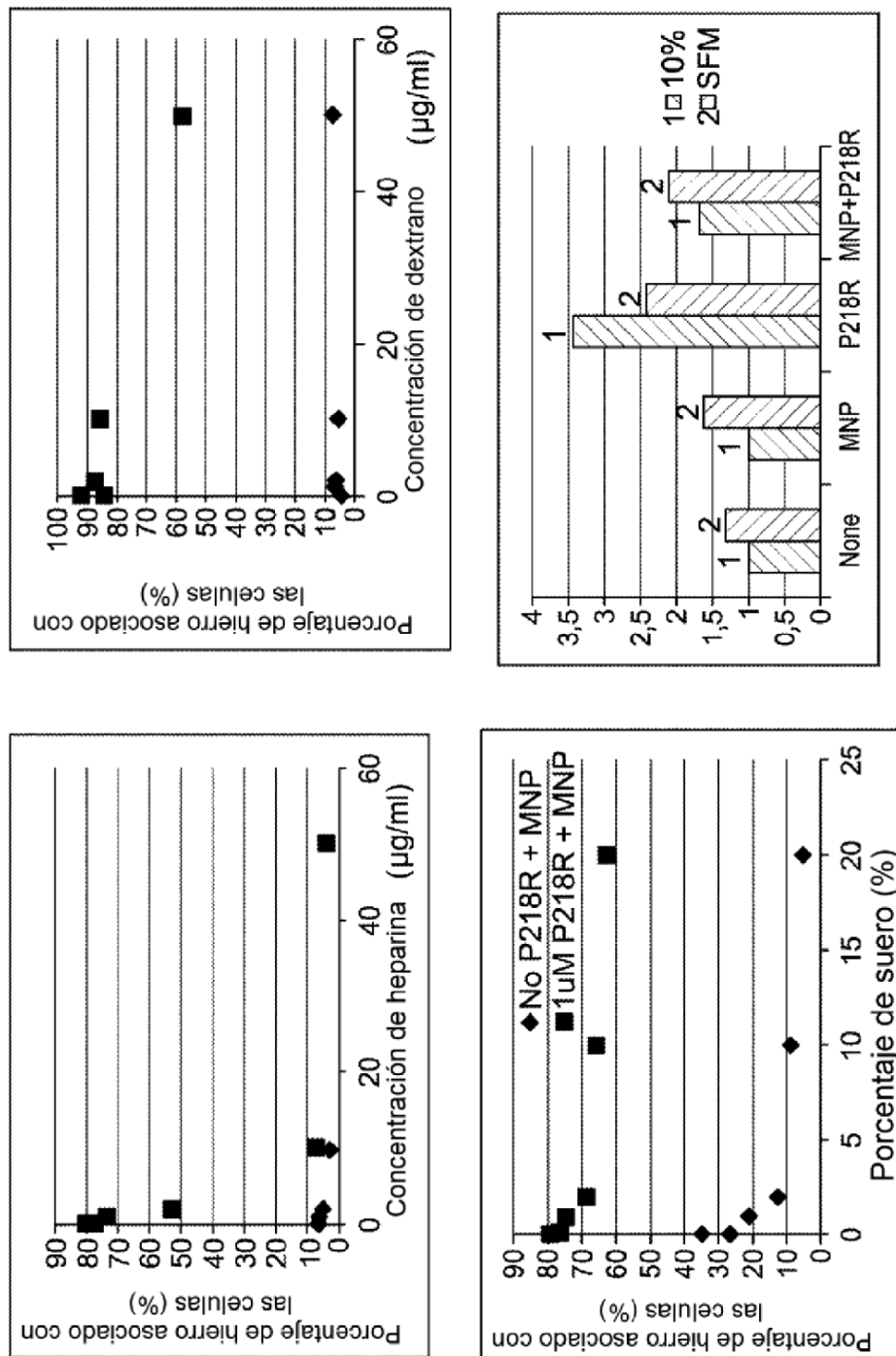


Figura 36

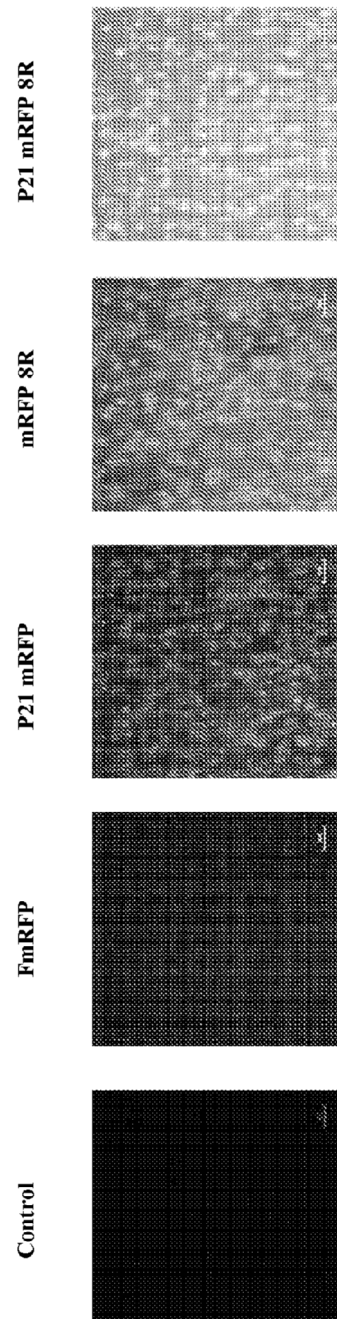


Figura 37

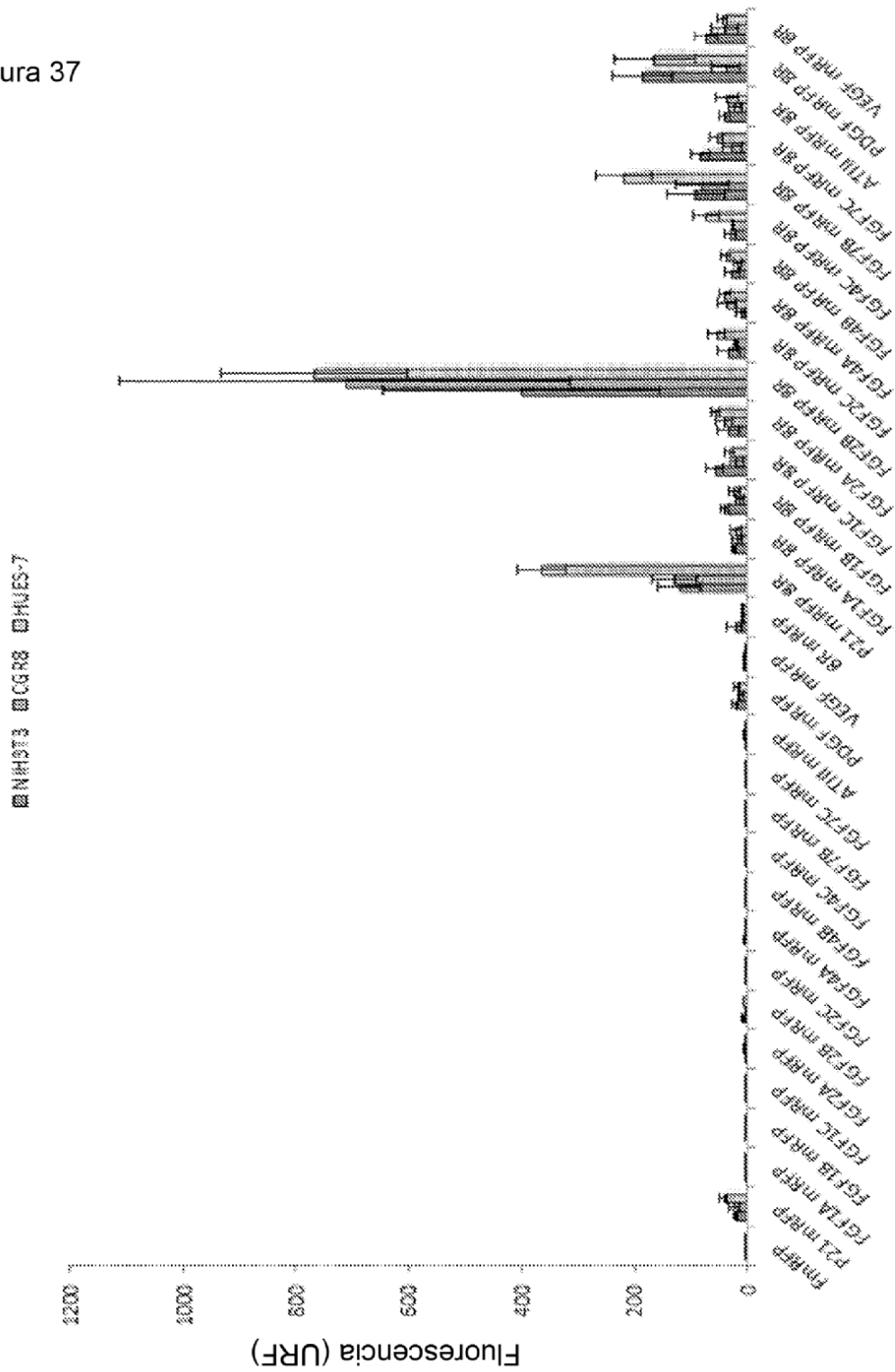


Figura 38

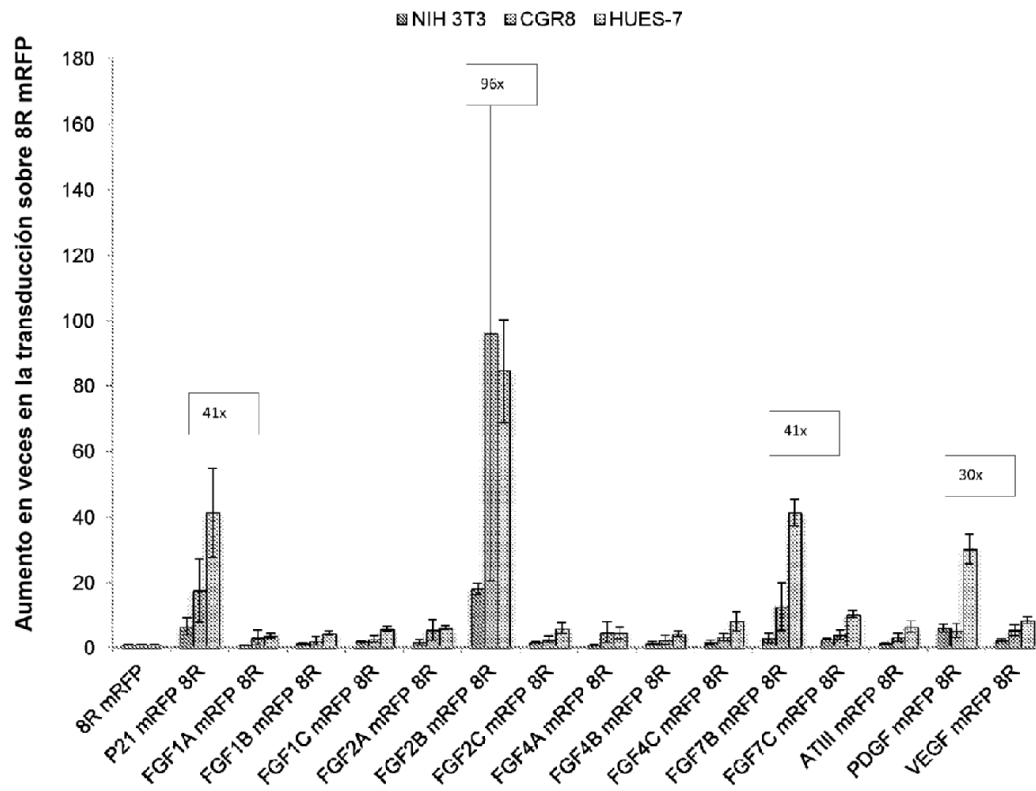


Figura 39

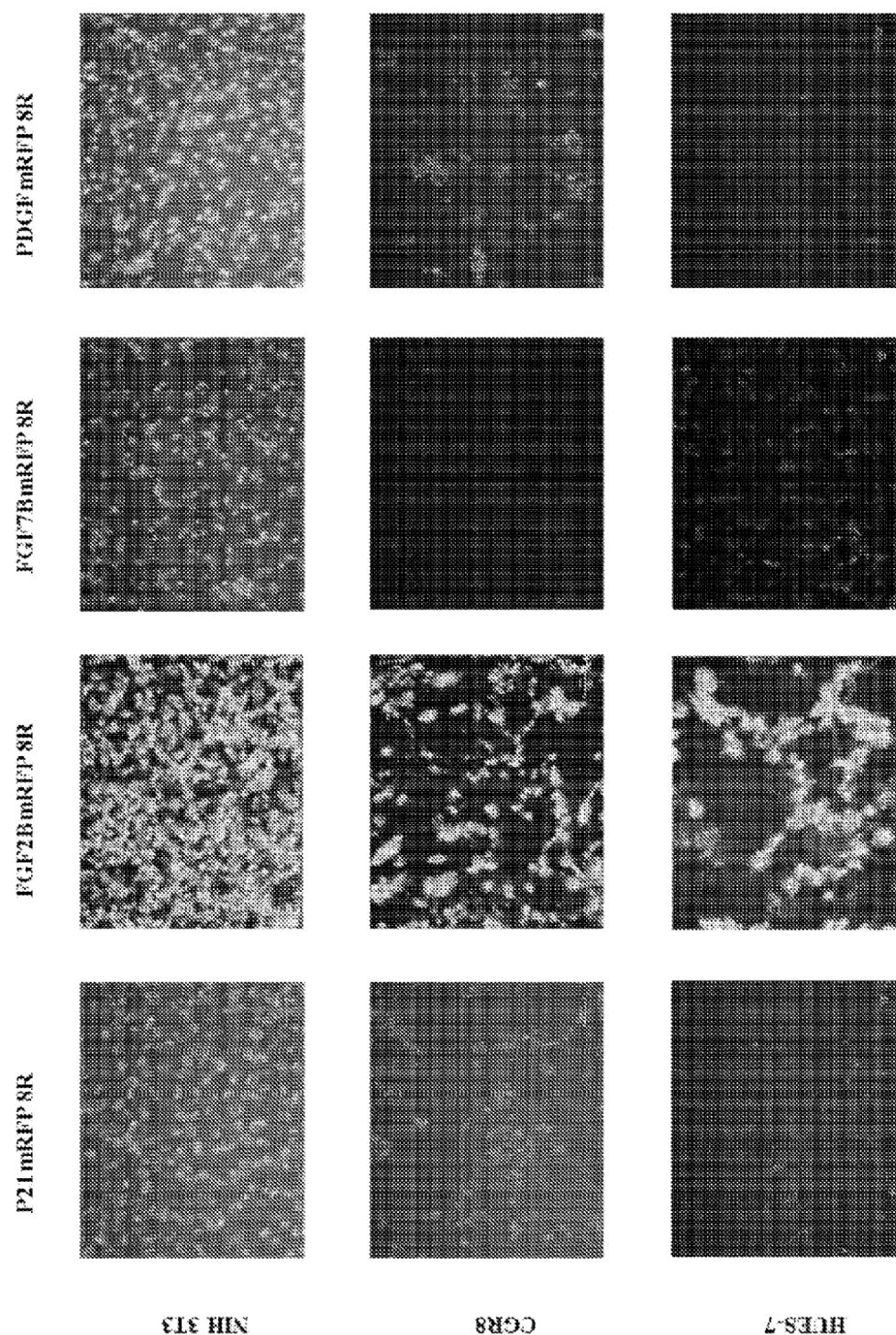


Figura 40

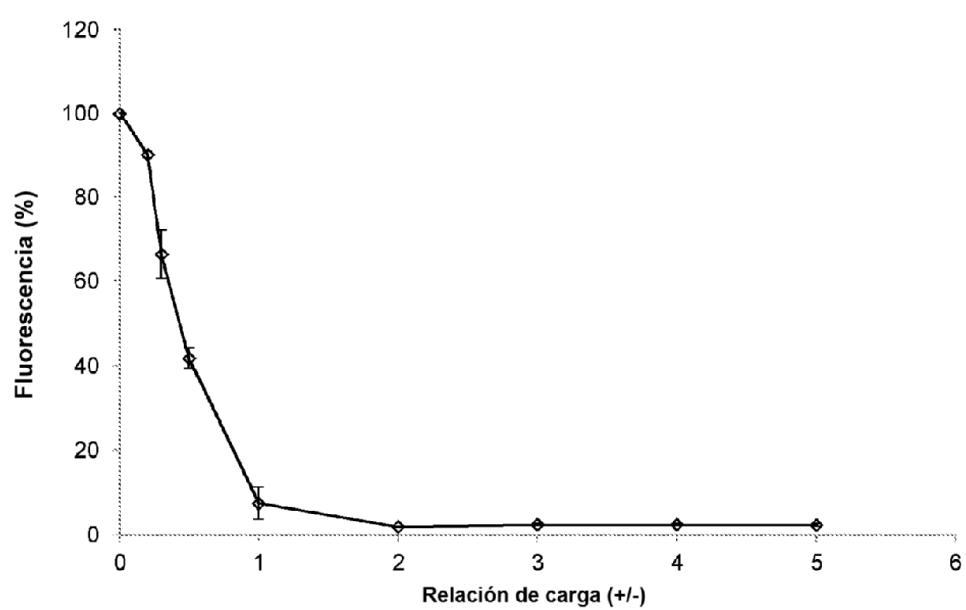


Figura 41

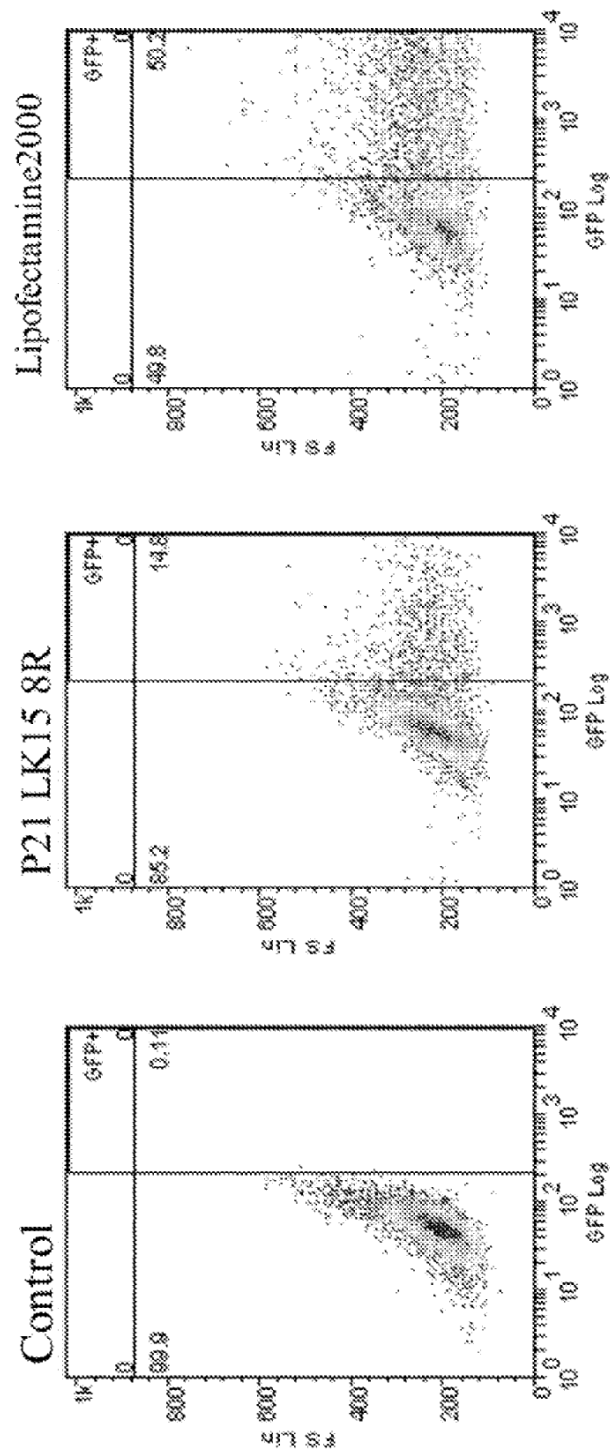


Figura 42

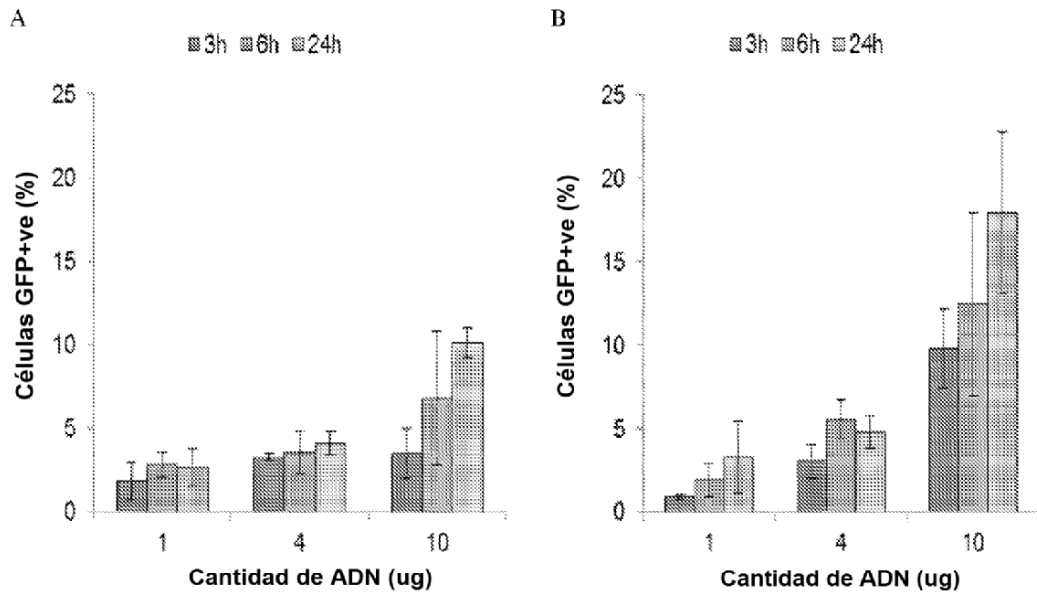


Figura 43

