

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 188**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

C12N 9/99 (2006.01)

C12N 15/113 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2015 PCT/EP2015/081197**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2016 WO16102687**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2015 E 15825938 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3237436**

54 Título: **Péptidos y nanopartículas para el suministro intracelular de moléculas**

30 Prioridad:

24.12.2014 FR 1403004

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

18.02.2020

73 Titular/es:

**AADIGEN, LLC (100.0%)
1343 Luna Vista Drive
Pacific Palisades, CA 90272, US**

72 Inventor/es:

**DIVITA, GILLES y
DESAI, NEIL**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 743 188 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos y nanopartículas para el suministro intracelular de moléculas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a péptidos y complejos/nanopartículas que contienen péptidos que son útiles para estabilizar y suministrar moléculas de carga tales como ácidos nucleicos.

10 **Antecedentes**

Aunque las moléculas pequeñas siguen siendo los principales fármacos usados en la clínica, en numerosos casos, su impacto terapéutico ha alcanzado limitaciones tales como la capacidad insuficiente para alcanzar dianas, falta de especificidad, necesidad de altas dosis que provocan toxicidad y efectos secundarios importantes. En los últimos diez años, para sortear las limitaciones de las moléculas pequeñas y de las terapias basadas en genes, hemos sido testigos de una aceleración dramática en el descubrimiento de moléculas terapéuticas más grandes, tales como proteínas, péptidos y ácidos nucleicos que presentan una alta especificidad por su diana pero que no siguen las reglas de Lipinski. La potencia farmacéutica de estas moléculas sigue restringida por su escasa estabilidad *in vivo* y por su baja captación por las células. Por lo tanto, el "suministro" se ha convertido en una pieza central del puzzle terapéutico y se han establecido nuevos hitos para validar las estrategias de suministro: (a) falta de toxicidad, (b) eficiencia a bajas dosis *in vivo*, (c) facilidad de manipulación para aplicaciones terapéuticas, (d) liberación endosómica rápida y (e) capacidad para alcanzar la diana. Aunque las estrategias de administración viral habían dado mucha esperanza para las terapias génicas y celulares, su aplicación clínica ha sufrido efectos secundarios y de toxicidad (Ibraheem et al. (2014) Int J Pharm 459, 70-83). Las investigaciones se centraron principalmente en el desarrollo de estrategias no víricas y se han propuesto diferentes métodos, incluidos formulaciones a base de lípidos, nanopartículas policationicas y péptidos, pero solo algunas de estas tecnologías han sido eficientes *in vivo* y han llegado a la clínica (Yin et al. (2014) Nat Rev Genet 15, 541-555). Los péptidos penetrantes en células (CPP) son una de las estrategias no víricas más prometedoras. Aunque la definición de CPP se encuentra en constante evolución, generalmente se describen como péptidos cortos de menos de 30 aminoácidos procedentes de proteínas o de secuencias quiméricas. Por lo general, son anfipáticos y poseen una carga neta positiva (Langel U (2007) Handbook of Cell-Penetrating Peptides (CRC Taylor & Francis, Boca Raton); Heitz et al. (2009) Br J Pharmacol 157, 195-206). Los CPP pueden penetrar las membranas biológicas, para activar el movimiento de varias biomoléculas a través de las membranas celulares hacia el citoplasma y mejorar su enrutamiento intracelular, facilitando de este modo las interacciones con la diana. Los CPP pueden subdividirse en dos clases principales, una primera que requiere enlace químico con la carga y una segunda que implica la formación de complejos no covalentes estables. Se ha informado que los CPP de ambas estrategias favorecen el suministro de un gran panel de cargas (ADN plasmídico, oligonucleótido, ARNpi, PNA, proteína, péptido, liposoma, nanopartículas...) en una amplia variedad de tipos de células y modelos *in vivo* (Langel U (2007) Handbook of Cell-Penetrating Peptides (CRC Taylor & Francis, Boca Raton); Heitz et al. (2009) Br J Pharmacol 157, 195-206; Mickan et al. (2014) Curr Pharm Biotechnol 15, 200-209; Shukla et al. (2014) Mol Pharm 11, 3395-3408).

El concepto de dominio de transducción de proteínas (PTD) se propuso inicialmente basándose en la observación de que algunas proteínas, principalmente factores de transcripción, pueden transportarse entre células y de una célula a otra (para una revisión, véase Langel U (2007) Handbook of Cell-Penetrating Peptides (CRC Taylor & Francis, Boca Raton); Heitz et al. (2009) Br J Pharmacol 157, 195-206). La primera observación se realizó en 1988, por Frankel y Pabo. Demostraron que la proteína transactivante de la transcripción (Tat) del HIV-1 puede entrar en las células y translocarse en el núcleo. En 1991, El grupo de Prochiantz llegó a las mismas conclusiones con el homeodominio Antennapedia de *Drosophila* y demostró que este dominio se internaliza por las células neuronales. Estos trabajos sentaron las bases para el descubrimiento en 1994 del primer dominio de transducción de proteínas: un péptido 16 mero procedente de la tercera hélice del homeodominio de Antennapedia denominado penetratina. En 1997, el grupo de Lebleu identificó la secuencia mínima de Tat necesaria para la captación celular y se comunicaron las primeras pruebas de concepto de la aplicación de PTD *in vivo* por el grupo de Dowdy para el suministro de péptidos pequeños y proteínas grandes (Gump JM y Dowdy SF (2007) Trends Mol Med 13, 443-448.). Históricamente, la noción del péptido penetrante en células (CPP) se introdujo por el grupo de Langel, en 1998, con el diseño del primer vehículo peptídico quimérico, el transportano, que se obtiene del fragmento N-terminal del neuropéptido, galanina, unido a matosparano, un péptido del veneno de la avispa. Originariamente, se comunicó que el transportano mejora el suministro de PNA (ácidos peptidonucleicos) tanto en células cultivadas como *in vivo* (Langel U (2007) Handbook of Cell-Penetrating Peptides (CRC Taylor & Francis, Boca Raton)). En 1997, El grupo de Heitz y Divita propuso una nueva estrategia que implica a CPP en la formación de complejos estables pero no covalentes con su carga (Morris et al. (1997) Nucleic Acids Res 25, 2730-2736). La estrategia se basó en primer lugar en el transportador peptídico corto (MPG) que consta de dos dominios: un dominio hidrófilo (polar) y un dominio hidrófobo (apolar). MPG se diseñó para el suministro de ácidos nucleicos. Posteriormente, se propuso el péptido anfipático primario Pep-1 para el suministro no covalente de proteínas y péptidos (Morris et al. (2001) Nat Biotechnol 19, 1173-1176). Luego, los grupos de Wender y de Futaki demostraron que las secuencias de poliarginina (Arg8) son suficientes para dirigir moléculas pequeñas y grandes hacia las células e *in vivo* (Nakase et al. (2004) Mol Ther 10, 1011-1022; Rothbard et al. (2004) J Am Chem Soc 126, 9506-9507). Desde entonces, se han identificado muchos CPP obtenidos de secuencias naturales o no naturales y la lista aumenta constantemente. Se han obtenido péptidos de la proteína VP22 del virus del herpes simple,

de calcitonina, de péptidos antimicrobianos o toxinas, de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, así como de péptidos ricos en poliprolina (Heitz et al. (2009) Br J Pharmacol 157, 195-206). Más recientemente, se ha descrito una nueva estrategia no covalente basada en CPP anfipáticos secundarios. Estos péptidos, tales como las familias CADY y VEPEP son capaces de autoensamblarse en una forma helicoidal con restos hidrófilos e hidrófobos en un lado diferente de la molécula. El documento WO2012/137150 divulga péptidos VEPEP-6; el documento US2010/0099626 describe péptidos CADY; y el documento WO2014/053880 divulga VEPEP-9. El documento WO-A1-2014053624 (CNRS) divulga péptidos penetrantes en células alternativas.

Breve resumen de la invención

La presente solicitud proporciona una nueva clase de péptidos (péptidos de ADGN) útiles para estabilizar y suministrar moléculas de carga, tales como ácidos nucleicos. En un aspecto, se proporciona un péptido de origen no natural que comprende una secuencia de aminoácidos X_1 KWRSX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 1), en donde X₁ es cualquier aminoácido no está ausente y en donde X₂-X₈ son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X₁ es βA, S o está ausente, X₂ es A o V, X₃ es G o L, X₄ es W o Y, X₅ es V o S, X₆ es R, V o A, X₇ es S o L y X₈ es W o Y. En algunas realizaciones, se proporciona un péptido de origen no natural que comprende la secuencia de aminoácidos de KWRSAGWRWRLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 2), KWRSALYRWRLWRSRSWSR (SEQ ID NO: 3) o KWRSALYRWRLWRSALYSR (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, el péptido tiene 19 o 20 aminoácidos de longitud.

En algunas realizaciones de acuerdo con cualquiera de los péptidos descritos anteriormente, el péptido comprende además uno o más restos unidos covalentemente al extremo N-terminal del péptido, en donde los uno o más restos se seleccionan entre el grupo que consiste en un grupo acetilo, un grupo estearilo, un ácido graso, un colesterol, un lípido (incluyendo un fosfolípido), un polietilenglicol, una señal de localización nuclear, una señal de exportación nuclear, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo, un péptido, un polisacárido y una molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el péptido comprende un grupo acetilo unido covalentemente a su extremo N-terminal. En algunas realizaciones, el péptido comprende además uno o más restos unidos covalentemente al extremo C-terminal del péptido, en donde los uno o más restos se seleccionan entre el grupo que consiste en un grupo cisteamida, una cisteína un tiol, una amida, un ácido nitrilotriacético, un grupo carboxilo, un grupo alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado, una amina primaria o secundaria, un derivado osídico, un lípido, un fosfolípido, un ácido graso, un colesterol, un polietilenglicol, una señal de localización nuclear, una señal de exportación nuclear, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo, un péptido, un polisacárido y una molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el péptido comprende un grupo cisteamida unido covalentemente a su extremo C-terminal. En algunas realizaciones, el péptido es "puro", es decir, no contiene ningún otro resto descrito anteriormente.

En algunas realizaciones de acuerdo con cualquiera de los péptidos descritos anteriormente, el péptido está grapado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el péptido comprende un enlace hidrocarburo entre dos restos que están separados por tres o seis restos. En algunas realizaciones, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de:

- aa) KWRS_sAGWR_sWRLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 7),
- ab) KWR_sSAGWR_sWRLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 8),
- ac) KWRSAGWR_sWRLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 9),
- ba) KWRS_sALYR_sWRLWRSRSWSR (SEQ ID NO: 10),
- bb) KWR_sSALYR_sWRLWRSRSWSR (SEQ ID NO: 11),
- be) KWRSALYR_sWRLWRSRSWSR (SEQ ID NO: 12),
- bd) KWRSALYR_sWRLWRSRSWSR (SEQ ID NO: 13),
- be) KWRSALYRWRLWRS_sRSWS_sR (SEQ ID NO: 14),
- ca) KWR_sSALYR_sWRLWRSALYSR (SEQ ID NO: 15),
- cb) KWRS_sALYR_sWRLWRSALYSR (SEQ ID NO: 16),
- cc) KWRSALYRWRLWRS_sALYSR (SEQ ID NO: 17) o
- cd) KWRSALYRWRLWRS_sALYS_sR (SEQ ID NO: 18),

en donde los restos marcados con un subíndice "s" son los dos restos unidos por el enlace hidrocarburo.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los péptidos descritos anteriormente, la porción del péptido que tiene la secuencia X_1 KWRSX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 1) forma un único motivo helicoidal central. En algunas realizaciones, la porción del péptido que tiene la secuencia X_1 KWRSX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 1) forma una estructura helicoidal en donde los restos S o R se encuentran en el mismo lado y los restos W se encuentran en el otro lado, formando un parche de contactos electrostáticos en un lado y contactos hidrófobos en el otro lado de la hélice.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un complejo que comprende (que incluye, que consta esencialmente de o que consiste en) uno cualquiera de los péptidos de ADGN como se han descrito anteriormente y una molécula de carga. En otro aspecto de la presente solicitud, se proporciona una nanopartícula que comprende (que incluye, que consta esencialmente de o que consiste en) uno cualquiera de los péptidos de ADGN como se han descrito anteriormente y una molécula de carga. En algunas realizaciones, la carga está cargada. En algunas realizaciones, la

carga no está cargada. En algunas realizaciones, la carga se modifica física o químicamente. En algunas realizaciones, la carga está sin modificar. En algunas realizaciones, la molécula de carga es un ácido nucleico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico se selecciona entre el grupo que consiste en un ARNpi, un miARN, un ARN antisentido, un plásmido de ADN y un análogo de los mismos. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es un oligonucleótido.

5 En algunas realizaciones, el plásmido de ADN codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une específicamente a un antígeno diana, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. En algunas realizaciones, el antígeno diana se selecciona entre el grupo que consiste en CD19, CD20, CD28, OX40, GITR, CD137, CD27, HVEM, BCMA, CD70, CD74, CD38, CD138, CD33, Lewis-Y, CD123, CD44v6 y CS1. En algunas realizaciones, el ácido nucleico se selecciona entre el grupo que consiste

10 en un ARN monocatenario, un ADN monocatenario, un ARN bicatenario, un ADN bicatenario y derivados de los mismos. En algunas realizaciones, el ácido nucleico tiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el ácido nucleico tiene hasta aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el ácido nucleico tiene más de aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. En algunas

15 realizaciones, el ácido nucleico contiene al menos un enlace modificado, tal como un enlace fosforotioato o modificaciones en la posición 2' del anillo de ribosa, incluyendo 2'-metoxi, 2'-fluoro y 2'-O-metoxietilo.

En algunas realizaciones de acuerdo con cualquiera de los complejos o las nanopartículas descritas anteriormente, la relación molar de la molécula de carga al péptido de ADGN en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:80 (incluyendo, por ejemplo, aproximadamente cualquiera de aproximadamente 1:1 a

20 aproximadamente 1:5, de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:10, de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:15, de aproximadamente 1:15 a aproximadamente 1:20, de aproximadamente 1:20 a aproximadamente 1:25, de aproximadamente 1:25 a aproximadamente 1:30, de aproximadamente 1:30 a aproximadamente 1:35, de aproximadamente 1:35 a aproximadamente 1:40, de aproximadamente 1:40 a aproximadamente 1:45, de aproximadamente 1:45 a aproximadamente 1:50, de aproximadamente 1:50 a

25 aproximadamente 1:55, de aproximadamente 1:55 a aproximadamente 1:60, de aproximadamente 1:60 a aproximadamente 1:65, de aproximadamente 1:65 a aproximadamente 1:70, de aproximadamente 1:70 a aproximadamente 1:75 y de aproximadamente 1:75 a aproximadamente 1:80).

En algunas realizaciones, la molécula de carga está complejada con una molécula de ensamblaje (tal como un péptido, una proteína, un anticuerpo, un lípido, un fosfolípido, un polímero, un aptámero, una nanopartícula, un liposoma, un dendrímero, un polimerosoma, un vector vírico y una micela) para formar un núcleo de una nanopartícula. En algunas realizaciones, la molécula de ensamblaje es uno cualquiera de los péptidos de ADGN como se han descrito anteriormente (por ejemplo, la nanopartícula puede comprender (incluir, constar esencialmente de o consistir en) un núcleo que comprende un péptido de ADGN y una molécula de carga. En algunas realizaciones, la molécula de

30 ensamblaje no es un péptido de ADGN (por ejemplo, la nanopartícula puede comprender un núcleo que comprende una molécula de carga y un péptido distinto de ADGN, que después se recubre con un péptido de ADGN). En algunas realizaciones, la nanopartícula comprende además una capa superficial. En algunas realizaciones, la capa superficial comprende uno cualquiera de los péptidos de ADGN como se han descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la capa superficial comprende un péptido penetrante en células que no es un péptido de ADGN. En algunas

35 realizaciones, la nanopartícula comprende además una capa intermedia. En algunas realizaciones, la capa intermedia comprende uno cualquiera de los péptidos de ADGN como se han descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la capa intermedia comprende un péptido penetrante en células que no es un péptido de ADGN.

En algunas realizaciones de acuerdo con una cualquiera de las nanopartículas descritas anteriormente, la nanopartícula comprende un resto de direccionamiento en la superficie. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento está unido a un péptido (tal como un péptido de ADGN). En algunas realizaciones, el péptido está unido covalentemente al resto de direccionamiento. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento dirige la nanopartícula a un tejido o célula específica.

En algunas realizaciones de acuerdo con una cualquiera de las nanopartículas descritas anteriormente, el tamaño (diámetro) de la nanopartícula es de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 300 nm. En algunas realizaciones, el tamaño (diámetro) de la nanopartícula es de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 200 nm. En algunas realizaciones, el tamaño (diámetro) de la nanopartícula es de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 140 nm. En algunas realizaciones, el tamaño (diámetro) de las nanopartículas es de no más de aproximadamente uno

50 cualquiera de 150 nm, 140 nm, 130 nm, 120 nm, 110 nm o 100 nm.

En algunas realizaciones, el valor absoluto del potencial zeta de las nanopartículas es de no más de aproximadamente 50 mV, incluyendo, por ejemplo, no más de aproximadamente cualquiera de 40 mV, 30 mV, 20 mV, 10 mV, 9 mV, 8 mV, 7 mV, 6 mV o 5 mV. En algunas realizaciones, el potencial zeta de las nanopartículas es de aproximadamente -

60 15 a aproximadamente 15 mV, tal como de aproximadamente -5 a aproximadamente 10 mV.

En algunas realizaciones de acuerdo con una cualquiera de las nanopartículas o complejos descritos anteriormente, la nanopartícula o el complejo comprende una pluralidad de moléculas de carga. En algunas realizaciones, la nanopartícula o el complejo comprende al menos aproximadamente cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 moléculas de carga diferentes (tales como ácidos nucleicos). En algunas realizaciones, las cargas son del mismo tipo (por ejemplo, una pluralidad de miARN o ARNpi). En algunas realizaciones, las cargas son de diferentes tipos.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición (tal como una composición farmacéutica) que comprende una cualquiera de las nanopartículas descritas anteriormente. En algunas realizaciones, el diámetro medio de las nanopartículas en la composición es de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 300 nm. En algunas realizaciones, el diámetro medio de las nanopartículas en la composición es de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 200 nm. En algunas realizaciones, el diámetro medio de las nanopartículas en la composición es de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 140 nm. En algunas realizaciones, el diámetro medio de las nanopartículas en la composición es de no más de aproximadamente uno cualquiera de 150 nm, 140 nm, 130 nm, 120 nm, 110 nm o 100 nm. En algunas realizaciones, la composición tiene un índice de polidispersidad de no más de aproximadamente uno cualquiera de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 o 0,5. En algunas realizaciones, las nanopartículas en la composición comprenden las mismas moléculas de péptidos de ADGN y de carga. En algunas realizaciones, las nanopartículas en la composición comprenden diferentes moléculas de péptidos de ADGN y/o de carga.

En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas es una suspensión líquida de las nanopartículas. En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas está liofilizada. En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas es estable durante al menos aproximadamente cualquiera de 24 horas, 48 horas, 72 horas, 4 días, 10 días, 30 días, 60 días, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses o más tiempo a temperatura ambiente o en condiciones refrigeradas, por ejemplo, sin precipitación, agregación, cambio de tamaño y/o pérdida de eficacia.

En otro aspecto de la presente solicitud, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración intravenosa, intratumoral, intraarterial, tópica, intraocular, oftálmica, intracraneal, intratecal, intravesicular, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intranasal, intratraqueal, pulmonar, intracavidad u oral. En algunas realizaciones, el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un azúcar o una proteína. En algunas realizaciones, el azúcar se selecciona entre el grupo que consiste en sacarosa, glucosa, manitol y una combinación de los mismos y opcionalmente está presente en la composición farmacéutica a una concentración de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 20 %. En algunas realizaciones, la proteína es albúmina. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica está liofilizada.

En otro aspecto más de la presente solicitud, se proporciona un método para preparar una nanopartícula como se ha descrito anteriormente, que comprende a) combinar un péptido de ADGN como se ha descrito anteriormente con una molécula de carga, para formar una mezcla y b) incubar la mezcla para formar la nanopartícula.

En otro aspecto de la presente solicitud, se proporciona un método para estabilizar moléculas de carga (tales como un ácido nucleico), que comprende combinar las moléculas de carga con un péptido de ADGN como se ha descrito anteriormente, estabilizando de este modo las moléculas de carga. En algunas realizaciones, la molécula de carga y el péptido de ADGN forman un complejo o nanopartícula, como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la molécula de carga es un ácido nucleico y el péptido de ADGN estabiliza la estructura de hélice superenrollada del ácido nucleico. En algunas realizaciones, la molécula de carga es susceptible a la degradación (por ejemplo, por componentes del suero o nucleasas *in vitro* o *in vivo*) y el péptido de ADGN protege a la molécula de carga frente a la degradación.

En un aspecto adicional de la presente solicitud, se proporciona un complejo o una nanopartícula para su uso en un método para tratar una enfermedad en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una molécula de carga y un péptido de ADGN (por ejemplo, en forma de complejos o nanopartículas) como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la enfermedad se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas. En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer, tal como un tumor sólido.

En algunas realizaciones, la administración de la composición farmacéutica da como resultado la modulación de la expresión de uno o más genes. Los genes adecuados cuya expresión puede modularse mediante los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, aquellos que codifican factores de crecimiento, citocinas, receptores de la superficie celular, moléculas de señalización, cinasas, factores de transcripción u otros moduladores de la transcripción, reguladores de la expresión o modificación de proteínas y reguladores de la apoptosis o la metástasis. En algunas realizaciones, al menos uno de los uno o más genes codifica un factor de crecimiento o citocina que incluye, pero sin limitación, EGF, VEGF, FGF, HGF, HDGF, IGF, PDGF, TGF- α , TGF- β , TNF- α y wnt. En algunas realizaciones, al menos uno de los uno o más genes codifica un factor de crecimiento o citocina que incluye, pero sin limitación, EGF, VEGF, FGF, HGF, HDGF, IGF, PDGF, TGF- α , TGF- β , TNF- α y wnt. En algunas realizaciones, al menos uno de los uno o más genes codifica un receptor de la superficie celular que incluye, pero sin limitación, ER, PR, Her2, Her3, receptor de angiopoyetina, EGFR, FGFR, HGFR, HDGFR, IGFR, KGFR, MSFR, PDGFR, TGFR, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, receptores de la familia de Frizzled (FZD-1 a 10), smoothed, patched y CXCR4. En algunas realizaciones, al menos uno de los uno o más genes codifica una molécula de señalización o cinasa que incluye, pero sin limitación, KRAS, NRAS, RAF, MEK, MEKK, MAPK, MKK, ERK, JNK, JAK, PKA, PKC, PI3K, Akt, mTOR, Raptor, Rictor, MLST8, PRAS40, DEPTOR, MSIN1, S6 cinasa, PDK1, BRAF, FAK, Src, Fyn, Shc, GSK, IKK, PLK-1, cinasas dependientes de ciclina (Cdk1 a 13), cinasas activantes de CDK, ALK/Met, Syk, BTK, Bcr-Abl, RET,

- 5 β -catenina, Mcl-1 y PKN3. En algunas realizaciones, al menos uno de los uno o más genes codifica un factor de transcripción u otro modulador de la transcripción, incluyendo, pero sin limitación, ATF-2, Chop, c-Jun, c-Myc, DPC4, Elk-1, Ets1, Max, MEF2C, NFAT4, Sap1a, STAT, Tal, p53, CREB, Myc, NF- κ B, HDAC, HIF-1 α y RRM2. En algunas realizaciones, al menos uno de los uno o más genes codifica un regulador de la expresión o modificación de proteínas, incluyendo, pero sin limitación, ubiquitina ligasa, LMP2, LMP7, MECL-1 y miARN. En algunas realizaciones, al menos uno de los uno o más genes codifica un regulador de la apoptosis o la metástasis, incluyendo, pero sin limitación, XIAP, Bcl-2, osteopontina, SPARC, MMP-2, MMP-9 y uPAR.
- 10 En algunas realizaciones, en donde la enfermedad es un tumor sólido, el gen cuya expresión se modula puede codificar una proteína implicada en el desarrollo y/o la progresión tumoral. En algunas realizaciones, la proteína implicada en el desarrollo y/o la progresión tumoral incluye, pero sin limitación, IL-2, IL-12, interferón gamma, GM-CSF, B7-1, caspasa-9, p53, MUC-1, MDR-1, HLA-B7/Beta 2-Microglobulina, Her2, Hsp27, timidina cinasa y MDA-7.
- 15 En algunas realizaciones, en donde la enfermedad es una neoplasia maligna hematológica, el gen cuya expresión se modula puede codificar una proteína implicada en el desarrollo y/o la progresión de la neoplasia maligna hematológica. En algunas realizaciones, la proteína implicada en el desarrollo y/o la progresión de la neoplasia maligna hematológica incluye, pero sin limitación, GLI1, CTNNB1, eIF5A, DDX3X mutante, hexocinasa II, histona metiltransferasa EZH2, ARK5, ALK, MUC1, HMGA2, HIF-1 alfa, IRF1, RPN13, HDAC11, Rad51, Spry2, mir-146a, mir-146b, survivina, MDM2, MCL1, CMYC, XBP1 (cortado y empalmado o sin cortar y empalmar), SLAMF7, CS1, Erbb4, Cxcr4 (macroglubulinemia de Waldenström), Myc, Bcl2, Prdx1 y Prdx2 (linfoma de Burkitt), Bcl6, Idh1, Idh2, Smad, Ccnd2, ciclina d1-2, B7-h1 (pdl-1) y Pyk2.
- 20 En algunas realizaciones, en donde la enfermedad es una enfermedad vírica infecciosa, el gen cuya expresión se modula puede codificar una proteína implicada en el desarrollo y/o progresión de la enfermedad vírica infecciosa. En algunas realizaciones, la proteína implicada en el desarrollo y/o la progresión de la enfermedad vírica infecciosa incluye, pero sin limitación, nucleocápside de RSV, Pre-gen/Pre-C, Pre-S1, Pre-S2/S,X, secuencias conservadas de VHB, Tat de VIH, ARN de TAR de VIH, CCR5 humano, miR-122, polimerasa L de EBOV, VP24, VP40, GP/sGP, VP30, VP35, NPC1 y TIM-1.
- 25 En algunas realizaciones, en donde la enfermedad es una enfermedad hereditaria, el gen cuya expresión se modula puede codificar una proteína implicada en el desarrollo y/o progresión de la enfermedad hereditaria. En algunas realizaciones, la proteína implicada en el desarrollo y/o la progresión de la enfermedad hereditaria incluye, pero sin limitación, Transtiretina, MDS1-EVI1, PRDM16, SETBP1, β -globina y LPL.
- 30 En algunas realizaciones, en donde la enfermedad es una enfermedad del envejecimiento o degenerativa, el gen cuya expresión se modula puede codificar una proteína implicada en el desarrollo y/o progresión de la enfermedad del envejecimiento o degenerativa. En algunas realizaciones, la proteína implicada en el desarrollo y/o la progresión de la enfermedad del envejecimiento o degenerativa incluye, pero sin limitación, queratina K6A, queratina K6B, queratina 16, queratina 17, p53, receptores β -2 adrenérgicos (ADRB2), TRPV1, VEGF, VEGFR, HIF-1, HIF-1 alfa y caspasa-2.
- 35 En algunas realizaciones, en donde la enfermedad es una enfermedad fibrótica o inflamatoria, el gen cuya expresión se modula puede codificar una proteína implicada en el desarrollo y/o progresión de la enfermedad fibrótica o inflamatoria. En algunas realizaciones, la proteína implicada en el desarrollo y/o la progresión de la enfermedad fibrótica o inflamatoria se selecciona entre el grupo que consiste en SPARC, CTGF, TGF β 1, receptor 1 de TGF β , receptor 2 de TGF β , receptor 3 de TGF β , VEGF, angiotensina II, TIMP, HSP47, trombospondina, CCN1, LOXL2, MMP2, MMP9, CCL2, receptor A2A de adenosina, receptor A2B de adenosina, adenililo ciclasa, Smad 3, Smad 4, Smad 7, SOX9, arrestina, PDCD4, PAI-1, NF- κ B y PARP-1.
- 40 En algunas realizaciones, en donde la enfermedad es una enfermedad fibrótica o inflamatoria, el gen cuya expresión se modula puede codificar una proteína implicada en el desarrollo y/o progresión de la enfermedad fibrótica o inflamatoria. En algunas realizaciones, la proteína implicada en el desarrollo y/o la progresión de la enfermedad fibrótica o inflamatoria se selecciona entre el grupo que consiste en SPARC, CTGF, TGF β 1, receptor 1 de TGF β , receptor 2 de TGF β , receptor 3 de TGF β , VEGF, angiotensina II, TIMP, HSP47, trombospondina, CCN1, LOXL2, MMP2, MMP9, CCL2, receptor A2A de adenosina, receptor A2B de adenosina, adenililo ciclasa, Smad 3, Smad 4, Smad 7, SOX9, arrestina, PDCD4, PAI-1, NF- κ B y PARP-1.
- 45 En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos de tratamiento descritos anteriormente, el individuo es un mamífero. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano.
- 50 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para administrar una molécula de carga en una célula que comprende poner en contacto la célula con una composición que comprende un péptido de ADGN y una molécula de carga (por ejemplo, en forma de un complejo o una nanopartícula, como se ha descrito anteriormente). En algunas realizaciones, la puesta en contacto con la célula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto con la célula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto con la célula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, la célula es un granulocito, un mastocito, un monocito, una célula dendrítica, un linfocito B, un linfocito T o una célula citolítica natural. En algunas realizaciones, la molécula de carga es un plásmido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une específicamente a un antígeno diana, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. En algunas realizaciones, el antígeno diana es un antígeno asociado con el cáncer. En algunas realizaciones, el complejo o nanopartícula comprende además un ARNpi. En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto la célula con una segunda composición que comprende un péptido de ADGN y un ARNpi (por ejemplo, en forma de un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente). En algunas realizaciones, el ARNpi se dirige específicamente a una molécula de ARN que codifica PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3 o CTLA-4.
- 55 En algunas realizaciones, la puesta en contacto con la célula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto con la célula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto con la célula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, la célula es un granulocito, un mastocito, un monocito, una célula dendrítica, un linfocito B, un linfocito T o una célula citolítica natural. En algunas realizaciones, la molécula de carga es un plásmido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une específicamente a un antígeno diana, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. En algunas realizaciones, el antígeno diana es un antígeno asociado con el cáncer. En algunas realizaciones, el complejo o nanopartícula comprende además un ARNpi. En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto la célula con una segunda composición que comprende un péptido de ADGN y un ARNpi (por ejemplo, en forma de un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente). En algunas realizaciones, el ARNpi se dirige específicamente a una molécula de ARN que codifica PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3 o CTLA-4.
- 60 En algunas realizaciones, la puesta en contacto con la célula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto con la célula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto con la célula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, la célula es un granulocito, un mastocito, un monocito, una célula dendrítica, un linfocito B, un linfocito T o una célula citolítica natural. En algunas realizaciones, la molécula de carga es un plásmido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une específicamente a un antígeno diana, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. En algunas realizaciones, el antígeno diana es un antígeno asociado con el cáncer. En algunas realizaciones, el complejo o nanopartícula comprende además un ARNpi. En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto la célula con una segunda composición que comprende un péptido de ADGN y un ARNpi (por ejemplo, en forma de un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente). En algunas realizaciones, el ARNpi se dirige específicamente a una molécula de ARN que codifica PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3 o CTLA-4.
- 65 En algunas realizaciones, la puesta en contacto con la célula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto con la célula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto con la célula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, la célula es un granulocito, un mastocito, un monocito, una célula dendrítica, un linfocito B, un linfocito T o una célula citolítica natural. En algunas realizaciones, la molécula de carga es un plásmido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une específicamente a un antígeno diana, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. En algunas realizaciones, el antígeno diana es un antígeno asociado con el cáncer. En algunas realizaciones, el complejo o nanopartícula comprende además un ARNpi. En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto la célula con una segunda composición que comprende un péptido de ADGN y un ARNpi (por ejemplo, en forma de un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente). En algunas realizaciones, el ARNpi se dirige específicamente a una molécula de ARN que codifica PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3 o CTLA-4.

En algunas realizaciones, de acuerdo con cualquiera de los métodos para administrar una molécula de carga a una célula descritos anteriormente, la molécula de carga es un ARNpi.

5 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para tratar una enfermedad en un individuo que comprende a) suministrar una molécula al interior de una célula de acuerdo con uno cualquiera de los métodos descritos anteriormente, produciendo de este modo una célula modificada que comprende la molécula, en donde la célula modificada es útil para el tratamiento de la enfermedad; y b) administrar la célula modificada al individuo. En algunas realizaciones, la célula modificada se administra por una vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intravesicular, subcutánea, intratecal, intrapulmonar, intramuscular, intratraqueal, intraocular, transdérmica, oral o por inhalación. En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano.

15 En otro aspecto más de la invención, se proporciona un kit que comprende una composición que comprende uno cualquiera de los péptidos de ADGN como se han descrito anteriormente e instrucciones para preparar un complejo y/o una nanopartícula como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el kit comprende además una composición que comprende una molécula ensamblada seleccionada entre el grupo que consiste en un péptido, una proteína, un anticuerpo, un lípido, un fosfolípido, un polímero, un aptámero, una nanopartícula, un liposoma, un dendrímero, un polimerosoma, un vector vírico y una micela.

20 Breve descripción de las figuras

La FIG. 1A muestra la administración *in vitro* de ARNpi para GAPDH mediante partículas de péptido/ARNpi en células HeLa. Las columnas de izquierda a derecha para cada grupo experimental corresponden a concentraciones de ARNpi de 0 nM, 10 nM, 20 nM, 50 nM, 80 nM, 100 nM, 150 nM y 200 nM, respectivamente.

25 La FIG. 1B muestra la administración *in vitro* de ARNpi para GAPDH mediante partículas de péptido/ARNpi en células Jurkat. Las columnas de izquierda a derecha para cada grupo experimental corresponden a concentraciones de ARNpi de 0 nM, 10 nM, 20 nM, 50 nM, 80 nM, 100 nM, 150 nM y 200 nM, respectivamente.

La FIG. 2 muestra la aplicación de complejos de péptido/ARNpi para SPARC en cepas de fibroblastos humanos primarios *in vitro* para simular un modelo de fibrosis *in vitro*.

30 La FIG. 3A muestra la evaluación de la toxicidad del péptido de ADGN y de los complejos de péptido/ARNpi en células HeLa mediante un ensayo de MTT. Las columnas de izquierda a derecha para concentración corresponden a control, ADGN-100, ADGN-100/ARNpi (1:20) y ADGN-100/ARNpi (1:40), respectivamente.

La FIG. 3B muestra la evaluación de la toxicidad del péptido de ADGN y los complejos de péptido/ARNpi en células HeLa y Jurkat mediante los niveles de ARNm de ciclofilina. Las líneas de arriba abajo a una concentración de péptido de 5 μ M corresponden a ADGN-100/ARNpi (1:40), control, ADGN-100 (1:20) y ADGN-100, respectivamente.

La FIG. 4 muestra la inhibición del crecimiento de tumores de HT-29 mediante la administración intravenosa de complejos de péptido de ADGN/ARNpi para ciclina B1. Las líneas de arriba abajo a los 51 días corresponden a ARNpi de control, PBS, Cyc-B1 (5 μ g) y CycB1 (10 μ g), respectivamente.

40 La FIG. 5 muestra la inhibición del crecimiento de tumores de HT-29 mediante la administración intravenosa de péptido de ADGN/ciclina B1, péptido de ADGN/cdc20 o una combinación de complejos de péptido de ADGN/ARNpi para ciclina B1/cdc20. Las líneas de arriba abajo a los 48 días corresponden a ARNpi de control, PBS, Cdc20 (5 μ g), Cyc-B1 (5 μ g) y Cyc-B1/Cdc20, respectivamente.

La FIG. 6A muestra la obtención de imágenes *in vivo* de la biodistribución de ARNpi marcado con Alexa700 a diversos intervalos después de una sola inyección intravenosa de complejo de ADGN-100/ARNpi.

La FIG. 6B muestra la obtención de imágenes *in vivo* de la biodistribución de ARNpi marcado con Alexa700 a diversos intervalos después de una sola inyección subcutánea de complejo de ADGN-100/ARNpi.

La FIG. 7A muestra la distribución en tejidos de ARNpi marcado con Alexa700 a diversos intervalos después de una sola inyección intravenosa de complejo de ADGN-100/ARNpi en ratones BALB/c.

50 La FIG. 7B muestra la distribución en tejidos de ARNpi marcado con Alexa700 a diversos intervalos después de una sola inyección intravenosa de complejo de ADGN-100/ARNpi en ratones portadores de tumores HT-29.

La FIG. 7C muestra la distribución en tejidos de ARNpi marcado con Alexa700 a diversos intervalos después de una sola inyección subcutánea de complejo de ADGN-100/ARNpi en ratones portadores de tumores HT-29.

La FIG. 8A muestra la actividad relativa de Factor VII después de la inyección intravenosa o la inyección subcutánea de complejo de ADGN-100/ARNpi; se incluye la inyección de ARNpi desnudo por comparación.

La FIG. 8B muestra la estabilidad de peso para los ratones en todos los grupos de tratamiento.

La FIG. 9 muestra la expresión de un indicador de luciferasa en líneas de linfocitos T después de la transfección mediada por ADGN-100, VEPEP-9, lipofectamina o sin vehículo (plásmido libre).

La FIG. 10 muestra el análisis por citometría de flujo de líneas celulares 293T y K562 transfectadas con un indicador de YFP en complejo con ADGN-100 o VEPEP-9.

La FIG. 11 muestra la expresión con el paso del tiempo de un indicador de YFP en células 293T o K562 después de la transfección mediada por ADGN-100.

La FIG. 12A muestra la microscopía de fluorescencia de células 293T que expresan de manera estable un indicador de YFP después de la transfección mediada por ADGN-100.

65 La FIG. 12B muestra el análisis por citometría de flujo de células 293T que expresan de manera estable un indicador de YFP después de la transfección mediada por ADGN-100.

La FIG. 13 muestra la eficacia de la transfección en linfocitos T primarios de complejo de ADGN-100/vector anti-CAR de CD-19 a relaciones molares de 20:1 y 30:1; los resultados se normalizan para células no transfectadas.

La FIG. 14 muestra la viabilidad de linfocitos T primarios después de la transfección con complejo de ADGN-100/vector anti-CAR de CD-19 ensayada mediante citometría de flujo usando 7-AAD; los resultados se normalizan para células no transfectadas.

La FIG. 15 muestra modelos estructurales en 3 dimensiones de los péptidos ADGN-100, CADY, VEPEP-6 y VEPEP-9, que muestran las ubicaciones de las hélices y los parches aromáticos y electrostáticos.

La FIG. 16 muestra la evaluación de la toxicidad de los péptidos de ADGN, CADY, VEPEP-6 y VEPEP-9 y de complejos de péptidos/ARNpi en células HeLa mediante el ensayo MTT. Las líneas de arriba abajo a una concentración de péptido de 20 µM corresponden a ADGN-100/ARNpi, CADY/ARNpi, control, VEPEP-6/ARNpi, VEPEP-9/ARNpi, ADGN-100, CADY, VEPEP-6, VEPEP-9, respectivamente.

La FIG. 17 muestra la comparación *in vitro* del suministro de ARNpi mediante los péptidos de ADGN y VEPEP-6.

La FIG. 18 muestra la comparación *in vivo* del suministro de ARNpi por péptidos de ADGN, VEPEP-6 y VEPEP-9.

Las líneas de arriba abajo a los 51 días corresponden a ARNpi de control, PBS, VEPEP-9/Cyc-B1, VEPEP-6/Cyc-B1 y ADGN/Cyc-B1, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

La presente solicitud proporciona nuevos péptidos (citados en el presente documento como "péptidos de ADGN") adecuados para estabilizar y suministrar moléculas de carga, tales como ácidos nucleicos. Los péptidos de ADGN comprenden péptidos anfipáticos secundarios, con baja homología de secuencia con cualquier péptido penetrante en células conocido anteriormente. A diferencia de los péptidos penetrantes en célula anteriormente conocidos, tales como CADY y VEPEP-6, que contienen cada uno múltiples motivos helicoidales cortos, los péptidos de ADGN contienen un solo motivo helicoidal central. El motivo helicoidal expone restos de S o R en un lado y restos de W en el otro, formando superficies que son significativamente diferentes a las comunicadas anteriormente. De forma notable, los complejos (tales como nanopartículas) formadas con los péptidos de ADGN y las moléculas de carga contienen menos cargas positivas netas residuales (por ejemplo, próxima a la neutralidad). Además, a pesar de la suposición general de que se requiere una alta carga positiva neta residual para la penetración en células, los péptidos de ADGN mostraron una eficacia mejorada en el suministro de la carga cuando se compararon con péptidos penetrantes en células anteriormente conocidos. La tecnología de ADGN constituye un potente sistema de suministro no vírico para la modificación de linfocitos T promoviendo tanto el suministro génico como la captación celular de oligonucleótidos pequeños, tales como ARNpi o moléculas antisentido. La tecnología de ADGN es menos compleja, menos tóxica y más fácil de usar que los vectores víricos.

Por lo tanto, la presente solicitud proporciona, en un aspecto, nuevos péptidos de ADGN que se describen adicionalmente más adelante con más detalle.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para estabilizar moléculas de carga y métodos para suministrar moléculas de carga mediante el uso de péptidos de ADGN.

En otro aspecto, se proporcionan complejos o nanopartículas que comprenden un péptido de ADGN y una molécula de carga.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un péptido de ADGN y una molécula de carga (por ejemplo, en forma de complejos y nanopartículas) y usos de las mismas para tratar enfermedades.

Como se usa en el presente documento, la forma en singular "un", "una", "uno" y "el" o "la" incluye referencias al plural, a menos que se indique lo contrario.

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) realizaciones que se refieren a ese valor o parámetro per se. Por ejemplo, una descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X."

Las composiciones y métodos de la presente invención pueden comprender, consistir en o constar esencialmente de los elementos esenciales y las limitaciones de la invención descrita en el presente documento, así como cualesquiera ingredientes, componentes o limitaciones adicionales u opcionales descritos en el presente documento o útiles de otro modo.

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se usan según su uso convencional.

Péptidos de la presente invención

La presente invención proporciona péptidos de ADGN capaces de formar complejos y nanopartículas estables con diversas moléculas de carga, tales como oligonucleótidos pequeños o ADN plasmídico.

En algunas realizaciones, se proporciona un péptido (por ejemplo, un péptido de origen no natural) que comprende la

siguiente secuencia de aminoácidos:

X_1 KWRSX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 1), en donde

- 5 X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y
 X_2 - X_8 son cualquier aminoácido.

En algunas realizaciones, la porción del péptido que tiene la secuencia X_1 KWRSX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 1) forma un único motivo helicoidal central. En algunas realizaciones, la porción del péptido que tiene la secuencia X_1 KWRSX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 1) forma una estructura helicoidal donde los restos S o R se encuentran en el mismo lado y los restos W se encuentran en el otro lado, formando un parche de contactos electrostáticos y contactos hidrófobos en el otro lado de la hélice. En algunas realizaciones, el péptido tiene una toxicidad reducida en relación con los péptidos penetrantes en células VEPEP-6 o CADY. En algunas realizaciones, el péptido tiene 19 o 20 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el péptido tiene una longitud de no más de aproximadamente cualquiera de 50, 45, 40, 35, 30, 25 o 20 aminoácidos. En algunas realizaciones, el péptido tiene una longitud de no más de aproximadamente cualquiera de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 o más aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el péptido comprende un L-aminoácido. En algunas realizaciones, el péptido comprende un D-aminoácido.

En algunas realizaciones, el péptido comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:
 20 X_1 KWRSX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 1), en donde

- 25 X_1 es β A, S o está ausente, X_2 es A o V,
 X_3 es G o L,
 X_4 es W o Y,
 X_5 es V o S,
 X_6 es R, V o A,
 X_7 es S o L y
 X_8 es W o Y.

30 En algunas realizaciones, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de:

- a) KWRSAGWRWRLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 2),
 b) KWRSALYRWRLWRSRSWSR (SEQ ID NO: 3) o
 c) KWRSALYRWRLWRSALYSR (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

En algunas realizaciones, los péptidos comprenden la secuencia de aminoácidos de:
 40 X_1 KWRSAGWRWRLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 5), en donde

- X_1 es β A, S o está ausente.

En algunas realizaciones, el péptido tiene una o más características seleccionadas entre el grupo que consiste en:

- 45 a) uno o más motivos SR,
 b) uno o más restos de W o Y y
 c) restos de R.

En algunas realizaciones, el péptido permanece principalmente desplegado cuando se encuentra libre en solución. En algunas realizaciones, el péptido es capaz de adoptar al menos una estructura helicoidal parcial en presencia de una molécula de carga. En algunas realizaciones, la estructura helicoidal es una hélice, tal como, pero sin limitación, una hélice α . En algunas realizaciones, el péptido adopta una estructura helicoidal a lo largo de más de aproximadamente un 50 % (tal como más de aproximadamente cualquiera de un 55 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % y 95 %) de su longitud. En algunas realizaciones, la estructura helicoidal está ubicada principalmente en un motivo central del péptido, en donde el motivo central es la secuencia de aminoácidos RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 6) y en donde X_5 es V o S, X_6 es R, V o A, X_7 es S o L y X_8 es W o Y. En algunas realizaciones, el péptido comprende un solo motivo helicoidal. En algunas realizaciones, el motivo helicoidal único es el motivo central. En algunas realizaciones, la estructura helicoidal está configurada de tal forma que al menos 2 (tal como al menos cualquiera de 3, 4, 5, 6, 7 u 8) de los restos de S y R se encuentran en un lado de la estructura helicoidal y al menos 1 (tal como al menos cualquiera de 2, 3, 4 o 5) de los restos de W se encuentran en el lado opuesto de la estructura helicoidal. En algunas realizaciones, una mayoría de los restos de S y R se encuentran en un lado de la estructura helicoidal y una mayoría de los restos de W se encuentran en el lado opuesto de la estructura helicoidal. En algunas realizaciones, todos los restos de S y R se encuentran en un lado de la estructura helicoidal y todos los restos de W se encuentran en el lado opuesto de la estructura helicoidal. En algunas realizaciones, la estructura helicoidal está configurada de tal forma que se forma un parche de contactos electrostáticos en un lado de la estructura helicoidal y se forma un parche de contactos hidrófobos en el otro lado de la estructura helicoidal. En algunas realizaciones, el péptido adopta una sola hélice en presencia de una molécula de carga.

En algunas realizaciones, el péptido, cuando se combina con una molécula de carga, tiene una carga positiva neta residual menor que un CPP descrito anteriormente (tal como CADY o VEPEP-6) en complejo con la misma molécula de carga. En algunas realizaciones, el péptido, cuando se combina con una molécula de carga, tiene una carga positiva neta residual menor de aproximadamente un 80 % (tal como menor de aproximadamente cualquiera de un 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 % o 20 %) de la carga positiva neta residual de un CPP anteriormente descrito en complejo con la misma molécula de carga. En algunas realizaciones, el CPP previamente descrito es CADY o VEPEP-6.

Tabla 1: secuencia de péptidos de ADGN y péptidos previamente descritos

Péptidos	Secuencia
Péptidos de ADGN	a: KWRSAGWRWRLWVRVRSWSR (SEQ ID NO: 2) b: KWRSALYRWRLWRSRSWSR (SEQ ID NO: 3) c: KWRSALYRWRLWRSALYSR (SEQ ID NO: 4)
CADY	a: GLWRALWRLLRSLWRLWKA (SEQ ID NO: 19)
VEPEP-6	a: LWRALWRLWRSWRLWKA (SEQ ID NO: 20) b: LWRALWRLLRSLWRLWKA (SEQ ID NO: 21) c: LWRALWRLWRSWRLWKA (SEQ ID NO: 22) d: LWRALWRLLRSLWRLWKA (SEQ ID NO: 23) e: LWRALWRLRNLWRLWKA (SEQ ID NO: 24)
VEPEP-9	a: LRWWLRWASRWFSRWAWWR (SEQ ID NO: 26) b: LRWWLRWASRWASRWAWFR (SEQ ID NO: 27) c: RWWRWASRWALSWRWWR (SEQ ID NO: 28)

En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende además uno o más restos unidos al extremo N-terminal del péptido. En algunas realizaciones, los uno o más restos están unidos covalentemente al extremo N-terminal del péptido. En algunas realizaciones, los uno o más restos se seleccionan entre el grupo que consiste en un grupo acetilo, un grupo estearilo, un ácido graso, un colesterol, un polietilenglicol, una señal de localización nuclear, una señal de exportación nuclear, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo, un péptido, un polisacárido y una molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, los uno o más restos son un grupo acetilo y/o un grupo estearilo. En algunas realizaciones, el péptido comprende un grupo acetilo y/o un grupo estearilo unido a su extremo N-terminal. En algunas realizaciones, el péptido comprende un grupo acetilo unido a su extremo N-terminal. En algunas realizaciones, el péptido comprende un grupo acetilo y/o un grupo estearilo unido covalentemente a su extremo N-terminal. En algunas realizaciones, el péptido comprende un grupo acetilo unido covalentemente a su extremo N-terminal. En algunas realizaciones, el péptido comprende un grupo estearilo unido covalentemente a su extremo N-terminal.

En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende además uno o más restos unidos al extremo C-terminal del péptido. En algunas realizaciones, los uno o más restos están unidos covalentemente al extremo C-terminal del péptido. En algunas realizaciones, los uno o más restos se seleccionan entre el grupo que consiste en un grupo cisteamida, una cisteína un tiol, una amida, un ácido nitrilotriacético, un grupo carboxilo, un grupo alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado, una amina primaria o secundaria, un derivado osídico, un lípido, un fosfolípido, un ácido graso, un colesterol, un polietilenglicol, una señal de localización nuclear, una señal de exportación nuclear, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo, un péptido, un polisacárido y una molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, los uno o más restos son un grupo cisteamida. En algunas realizaciones, el péptido comprende un grupo cisteamida unido a su extremo C-terminal. En algunas realizaciones, el péptido comprende un grupo cisteamida unido covalentemente a su extremo C-terminal.

En algunas realizaciones, el péptido de ADGN está grapado. "Grapado", como se usa en el presente documento, se refiere a un enlace químico entre dos restos en un péptido. En algunas realizaciones, el péptido de ADGN está grapado, que comprende un enlace químico entre dos aminoácidos del péptido. En algunas realizaciones, los dos aminoácidos unidos por el enlace químico están separados por 3 o 6 aminoácidos. En algunas realizaciones, dos aminoácidos unidos por el enlace químico están separados por 3 aminoácidos. En algunas realizaciones, los dos aminoácidos unidos por el enlace químico están separados por 6 aminoácidos. En algunas realizaciones, cada uno de los dos aminoácidos enlazados por el enlace químico es R o S. En algunas realizaciones, cada uno de los dos aminoácidos enlazados por el enlace químico es R. En algunas realizaciones, cada uno de los dos aminoácidos enlazados por el enlace químico es S. En algunas realizaciones, uno de los dos aminoácidos enlazados por el enlace químico es R y el otro es S. En algunas realizaciones, el enlace químico es un enlace hidrocarburo.

En algunas realizaciones, el péptido de ADGN está grapado y comprende la secuencia de aminoácidos de:

- 5 aa) KWRS_sAGWR_sWRLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 7),
 ab) KWR_sSAGWRWR_sLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 8),
 ac) KWRSAGWR_sWRLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 9),
 10 ba) KWRS_sALYR_sWRLWRSRWSR (SEQ ID NO: 10),
 bb) KWR_sSALYRWR_sLWRSRWSR (SEQ ID NO: 11),
 be) KWRSALYR_sWRLWRSR_sSWSR (SEQ ID NO: 12),
 bd) KWRSALYRWR_sLWRS_sRWSR (SEQ ID NO: 13),
 be) KWRSALYRWRLWRS_sRSWS_sR (SEQ ID NO: 14),
 15 ca) KWR_sSALYRWR_sLWRSALYSR (SEQ ID NO: 15),
 cb) KWRS_sALYR_sWRLWRSALYSR (SEQ ID NO: 16),
 cc) KWRSALYRWRLWRS_sALYSR (SEQ ID NO: 17) o
 cd) KWRSALYRWRLWRS_sALYS_sR (SEQ ID NO: 18),

15 y en donde los restos marcados con un subíndice "S" son los dos restos unidos por el enlace hidrocarburo.

Complejos y nanopartículas

20 En algunas realizaciones, se proporciona un complejo que comprende un péptido de ADGN y una molécula de carga.
 En algunas realizaciones, el tamaño medio (diámetro) del complejo es de entre cualquiera de aproximadamente 30 nm y aproximadamente 10 micrómetros, incluyendo, por ejemplo, entre aproximadamente 50 nm y aproximadamente 1 micrómetro, entre aproximadamente 50 nm y aproximadamente 400 nm, entre aproximadamente 100 nm y aproximadamente 300 nm y entre aproximadamente 150 nm y aproximadamente 200 nm. En algunas realizaciones, la relación molar del péptido a la molécula de carga en el complejo es de entre aproximadamente 100:1 y aproximadamente 1:50, incluyendo, por ejemplo, entre aproximadamente 50:1 y aproximadamente 1:20, entre aproximadamente 20:1 y aproximadamente 1:10 y entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 1:1. En algunas realizaciones, el complejo es sustancialmente no tóxico. En algunas realizaciones, el complejo comprende una pluralidad de moléculas de carga. En algunas realizaciones, el complejo comprende una pluralidad de moléculas de carga presentes en una relación predeterminada. En algunas realizaciones, la relación predeterminada se selecciona para permitir el uso más eficaz del complejo en cualquiera de los métodos descritos con más detalle más adelante.

35 En algunas realizaciones, el complejo comprende un resto de direccionamiento. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento está unido a un péptido de ADGN. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento está unido covalentemente al péptido de ADGN. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento dirige el compuesto a un tejido o un tipo celular específico. En algunas realizaciones, el tejido es un tejido que necesita tratamiento. En algunas realizaciones, el complejo comprende un resto de direccionamiento que dirige el complejo a un tejido o célula que puede tratarse por la molécula de carga del complejo.

40 En algunas realizaciones, se proporciona una nanopartícula que comprende un péptido de ADGN y una molécula de carga. En algunas realizaciones, el tamaño medio (diámetro) de la nanopartícula es de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 300 nm, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 200 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 180 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 140 nm y de aproximadamente 90 nm a aproximadamente 120 nm. En algunas realizaciones, la relación molar del péptido a la molécula de carga en la nanopartícula es de entre aproximadamente 100:1 y aproximadamente 1:50, incluyendo, por ejemplo, entre aproximadamente 100:1 y aproximadamente 1:20, entre aproximadamente 90:1 y aproximadamente 1:10, entre aproximadamente 80:1 y aproximadamente 1:1 y entre aproximadamente 40:1 y aproximadamente 5:1. En algunas realizaciones, el potencial zeta de la nanopartícula es de aproximadamente -30 mV a aproximadamente 30 mV, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente -25 mV a aproximadamente 25 mV, de aproximadamente -20 mV a aproximadamente 20 mV, de aproximadamente -15 mV a aproximadamente 15 mV, de aproximadamente -10 mV a aproximadamente 10 mV y de aproximadamente -5 mV a aproximadamente 10 mV. En algunas realizaciones, la nanopartícula es sustancialmente no tóxica. En algunas realizaciones, la nanopartícula comprende una pluralidad de moléculas de carga. En algunas realizaciones, la nanopartícula comprende una pluralidad de moléculas de carga presentes en una relación predeterminada. En algunas realizaciones, la relación predeterminada se selecciona para permitir el uso más eficaz de la nanopartícula en cualquiera de los métodos descritos con más detalle más adelante.

55 En algunas realizaciones, la nanopartícula comprende la molécula de carga en complejo con una molécula de ensamblaje. El complejo de la molécula de carga y la molécula de ensamblaje puede comprender interacciones covalentes o no covalentes entre la molécula de carga y la molécula de ensamblaje. En algunas realizaciones, la molécula de carga en complejo con la molécula de ensamblaje forma un núcleo de la nanopartícula. En algunas realizaciones, la molécula de ensamblaje se selecciona entre el grupo que consiste en un péptido, una proteína, un anticuerpo, un lípido, un fosfolípido, un polímero, un aptámero, una nanopartícula, un liposoma, un dendrímero, un polimerosoma, un vector vírico y una micela. En algunas realizaciones, el péptido es un péptido penetrante en células. En algunas realizaciones, el péptido penetrante en células es un péptido de ADGN como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el péptido penetrante en células no es un péptido de ADGN como se ha descrito anteriormente e incluye, pero sin limitación, un péptido a base de PTD, un péptido anfipático, un péptido a base de poliarginina, un péptido MPG, un péptido CADY, un péptido VEPEP, un péptido Pep-1 y un péptido Pep-2.

En algunas realizaciones, la nanopartícula comprende además una capa superficial. En algunas realizaciones, la capa superficial comprende un péptido de ADGN como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la capa superficial comprende un péptido penetrante en células que no es un péptido de ADGN como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la capa superficial no comprende un péptido. En algunas realizaciones, la nanopartícula comprende además una capa intermedia entre el núcleo de la nanopartícula y la capa superficial. En algunas realizaciones, la capa intermedia comprende un péptido de ADGN como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la capa intermedia comprende un péptido penetrante en células que no es un péptido de ADGN como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la nanopartícula comprende un resto de direccionamiento en su superficie. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento está unido a un péptido. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento está unido covalentemente a un péptido. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento dirige la nanopartícula a un tejido o un tipo celular específico. En algunas realizaciones, el tejido es un tejido que necesita tratamiento. En algunas realizaciones, la nanopartícula comprende un resto de direccionamiento en su superficie que dirige la nanopartícula a un tejido o célula que puede tratarse mediante la molécula de carga de la nanopartícula.

En algunas realizaciones, se proporciona un complejo que comprende una molécula de carga (tal como al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más moléculas de carga) y un péptido, en donde el péptido comprende (incluye, por ejemplo, consiste esencialmente en o consta de) una secuencia de aminoácidos $X_1KWRX_2X_3X_4RWLWX_5X_6X_7X_8SR$ (SEQ ID NO: 1), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X_2-X_8 son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, se proporciona un complejo que comprende una molécula de ácido nucleico (tal como al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más moléculas de ácido nucleico) y un péptido, en donde el péptido comprende (incluye, por ejemplo, consiste esencialmente en o consta de) una secuencia de aminoácidos $X_1KWRX_2X_3X_4RWLWX_5X_6X_7X_8SR$ (SEQ ID NO: 1), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X_2-X_8 son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X_1 es βA , S o está ausente, X_2 es A o V, X_3 es G o L, X_4 es W o Y, X_5 es V o S, X_6 es R, V o A, X_7 es S o L y X_8 es W o Y. En algunas realizaciones, se proporciona un péptido de origen no natural que comprende la secuencia de aminoácidos de $KWRSAGWRWRLWRVRSWSR$ (SEQ ID NO: 2), $KWRSALYRWLWRSRSWSR$ (SEQ ID NO: 3) o $KWRSALYRWLWRSALYSR$ (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar de la molécula de carga al péptido en el complejo es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40).

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende nanopartículas que comprenden una molécula de carga (tal como al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más moléculas de carga) y un péptido, en donde el péptido comprende (incluye, por ejemplo, consiste esencialmente en o consta de) una secuencia de aminoácidos $X_1KWRX_2X_3X_4RWLWX_5X_6X_7X_8SR$ (SEQ ID NO: 1), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X_2-X_8 son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende nanopartículas que comprenden una molécula de ácido nucleico (tal como al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más moléculas de ácido nucleico) y un péptido, en donde el péptido comprende (incluye, por ejemplo, consiste esencialmente en o consta de) una secuencia de aminoácidos $X_1KWRX_2X_3X_4RWLWX_5X_6X_7X_8SR$ (SEQ ID NO: 1), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X_2-X_8 son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X_1 es βA , S o está ausente, X_2 es A o V, X_3 es G o L, X_4 es W o Y, X_5 es V o S, X_6 es R, V o A, X_7 es S o L y X_8 es W o Y. En algunas realizaciones, se proporciona un péptido de origen no natural que comprende la secuencia de aminoácidos de $KWRSAGWRWRLWRVRSWSR$ (SEQ ID NO: 2), $KWRSALYRWLWRSRSWSR$ (SEQ ID NO: 3) o $KWRSALYRWLWRSALYSR$ (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar de la molécula de carga al péptido en la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, el diámetro medio de las nanopartículas en la composición es de no más de aproximadamente 130 nm. En algunas realizaciones, el potencial zeta absoluto de las nanopartículas en la composición es de no más de aproximadamente 10 mV. En algunas realizaciones, la polidispersidad de las nanopartículas en la composición es de no más de aproximadamente 1,5.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende nanopartículas que comprenden: a) un núcleo que comprende una molécula de carga (tal como al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más moléculas de carga) y una molécula de ensamblaje, recubierta con b) un péptido, en donde el péptido comprende (incluye, por ejemplo, consiste esencialmente en o consta de) una secuencia de aminoácidos $X_1KWRX_2X_3X_4RWLWX_5X_6X_7X_8SR$ (SEQ ID NO: 1), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X_2-X_8 son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende nanopartículas que comprenden una molécula de ácido nucleico (tal como al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más moléculas de ácido nucleico) y un péptido, en donde el péptido comprende (incluye, por ejemplo, consiste esencialmente en o consta de) una secuencia de aminoácidos $X_1KWRX_2X_3X_4RWLWX_5X_6X_7X_8SR$ (SEQ ID NO: 1), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X_2-X_8 son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X_1 es βA , S o está ausente, X_2 es A o V, X_3 es G o L, X_4 es W o Y, X_5 es V o S, X_6 es R, V o A, X_7 es S o L y X_8 es W o Y. En algunas realizaciones, se proporciona un péptido de origen no natural que comprende la secuencia de aminoácidos de $KWRSAGWRWRLWRVRSWSR$ (SEQ ID NO: 2), $KWRSALYRWLWRSRSWSR$ (SEQ ID NO: 3) o $KWRSALYRWLWRSALYSR$ (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar de la molécula de carga al péptido en la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, el diámetro medio de las nanopartículas en la composición es de no más de aproximadamente 130 nm. En algunas

realizaciones, el potencial zeta absoluto de las nanopartículas en la composición es de no más de aproximadamente 10 mV. En algunas realizaciones, la polidispersidad de las nanopartículas en la composición es de no más de aproximadamente 1,5. En algunas realizaciones, la molécula de ensamblaje es un péptido penetrante en células.

- 5 En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende nanopartículas que comprenden: a) un núcleo que comprende una molécula de carga (tal como al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más moléculas de carga) y una molécula de ensamblaje, recubierta con b) un péptido, en donde el péptido comprende (incluye, por ejemplo, consiste esencialmente en o consta de) una secuencia de aminoácidos $X_1KWRX_2X_3X_4RWLWX_5X_6X_7X_8SR$ (SEQ ID NO: 1), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X_2 - X_8 son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende nanopartículas que comprenden una molécula de ácido nucleico (tal como al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más moléculas de ácido nucleico) y un péptido, en donde el péptido comprende (incluye, por ejemplo, consiste esencialmente en o consta de) una secuencia de aminoácidos $X_1KWRX_2X_3X_4RWLWX_5X_6X_7X_8SR$ (SEQ ID NO: 1), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X_2 - X_8 son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X_1 es βA , S o está ausente, X_2 es A o V, X_3 es G o L, X_4 es W o Y, X_5 es V o S, X_6 es R, V o A, X_7 es S o L y X_8 es W o Y. En algunas realizaciones, se proporciona un péptido de origen no natural que comprende la secuencia de aminoácidos de $KWRSAGRWRLWVRSWSR$ (SEQ ID NO: 2), $KWRSALYRWLWRSRSWSR$ (SEQ ID NO: 3) o $KWRSALYRWLWRSALYSR$ (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar de la molécula de carga al péptido en la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, el diámetro medio de las nanopartículas en la composición es de no más de aproximadamente 150 nm. En algunas realizaciones, el potencial zeta absoluto de las nanopartículas en la composición es de no más de aproximadamente 10 mV. En algunas realizaciones, la polidispersidad de las nanopartículas en la composición es de no más de aproximadamente 1,5. En algunas realizaciones, la molécula de ensamblaje es un péptido penetrante en células (tal como CADY o VEPEP-6). En algunas realizaciones, la molécula de ensamblaje es un péptido que comprende (incluye, por ejemplo, consiste esencialmente en o consta de) una secuencia de aminoácidos $X_1KWRX_2X_3X_4RWLWX_5X_6X_7X_8SR$ (SEQ ID NO: 1), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X_2 - X_8 son cualquier aminoácido. La molécula de ensamblaje en el núcleo puede ser igual o diferente al péptido en el recubrimiento.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30 En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende nanopartículas que comprenden: a) un núcleo que comprende una molécula de carga (tal como al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más moléculas de carga) y un péptido, recubierto con b) una capa superficial, en donde el péptido comprende (incluye, por ejemplo, consiste esencialmente en o consta de) una secuencia de aminoácidos $X_1KWRX_2X_3X_4RWLWX_5X_6X_7X_8SR$ (SEQ ID NO: 1), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X_2 - X_8 son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende nanopartículas que comprenden una molécula de ácido nucleico (tal como al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más moléculas de ácido nucleico) y un péptido, en donde el péptido comprende (incluye, por ejemplo, consiste esencialmente en o consta de) una secuencia de aminoácidos $X_1KWRX_2X_3X_4RWLWX_5X_6X_7X_8SR$ (SEQ ID NO: 1), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X_2 - X_8 son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X_1 es βA , S o está ausente, X_2 es A o V, X_3 es G o L, X_4 es W o Y, X_5 es V o S, X_6 es R, V o A, X_7 es S o L y X_8 es W o Y. En algunas realizaciones, se proporciona un péptido de origen no natural que comprende la secuencia de aminoácidos de $KWRSAGRWRLWVRSWSR$ (SEQ ID NO: 2), $KWRSALYRWLWRSRSWSR$ (SEQ ID NO: 3) o $KWRSALYRWLWRSALYSR$ (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar de la molécula de carga al péptido en la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, el diámetro medio de las nanopartículas en la composición es de no más de aproximadamente 130 nm. En algunas realizaciones, el potencial zeta absoluto de las nanopartículas en la composición es de no más de aproximadamente 10 mV. En algunas realizaciones, la polidispersidad de las nanopartículas en la composición es de no más de aproximadamente 1,5. En algunas realizaciones, la capa superficial comprende un péptido penetrante en células (tal como CADY o VEPEP-6).
- 35
- 40
- 45
- 50 En algunas realizaciones, un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente comprende un resto de direccionamiento, en donde el resto de direccionamiento es un ligando capaz de direccionamiento específico de células y/o nuclear. Un receptor de la superficie de la membrana celular y/o un marcador de la superficie celular es una molécula o estructura que puede unirse a dicho ligando con alta afinidad y preferentemente con alta especificidad.
- 55 Dicho receptor de la superficie de la membrana celular y/o marcador de la superficie celular es preferentemente específico para una célula particular, es decir, se encuentra predominantemente en un tipo de célula que en otro tipo de célula (por ejemplo, restos de galactosilo para dirigirse al receptor de asialoglucoproteínas en la superficie de hepatocitos). El receptor de la superficie de la membrana celular facilita el direccionamiento celular y la internalización al interior de la célula diana del ligando (por ejemplo, el resto de direccionamiento) y las moléculas unidas (por ejemplo, el complejo o nanopartícula de la invención). Se han descrito ampliamente en la bibliografía un gran número de restos de ligando/compañeros de unión a ligando que pueden usarse en el contexto de la presente invención. Dicho resto de ligando es capaz de conferir al complejo o la nanopartícula de la invención la capacidad de unirse a una molécula compañera de unión dada o una clase de moléculas de compañero de unión localizadas en la superficie de al menos una célula diana. Las moléculas compañeras de unión adecuadas incluyen, sin limitación, polipéptidos seleccionados entre el grupo que consiste en marcadores específicos de células, marcadores específicos de tejido, receptores celulares, antígenos víricos, epítomos antigénicos y marcadores asociados con tumores. Además, las moléculas
- 60
- 65

compañeras de unión pueden consistir en o comprender una o más moléculas de azúcar, lípido, glucolípido o anticuerpo. De acuerdo con la invención, un resto de ligando puede ser, por ejemplo, un lípido, un glucolípido, una hormona, un azúcar, un polímero (por ejemplo, PEG, polilisina, PET), un oligonucleótido, una vitamina, un antígeno, la totalidad o parte de una lectina, la totalidad o parte de un polipéptido, tal como, por ejemplo, JTS1 (documento WO 94/40958), un anticuerpo o un fragmento del mismo o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el resto de ligando usado en la presente invención es un péptido o polipéptido que tiene una longitud mínima de 7 aminoácidos. Es o bien un polipéptido nativo o bien un polipéptido procedente de un polipéptido nativo. "Procedente de" significa que contiene (a) una o más modificaciones con respecto a la secuencia nativa (por ejemplo, adición, eliminación y/o sustitución de uno o más restos), (b) análogos de aminoácidos, incluyendo aminoácidos de origen no natural, (c) enlaces sustituidos o (d) otras modificaciones conocidas en la técnica. Los polipéptidos que sirven como resto de ligando abarcan polipéptidos variantes y quiméricos obtenidos fusionando secuencias de diversos orígenes, tal como, por ejemplo, un anticuerpo humanizado que combina la región variable de un anticuerpo de ratón y la región constante de una inmunoglobulina humana. Además, dichos polipéptidos pueden tener una estructura lineal o ciclada (por ejemplo, flanqueando con restos de cisteína ambos extremos de un ligando polipeptídico). Además, el polipéptido que se usa como un resto de ligando puede incluir modificaciones de su estructura original mediante la sustitución o adición de restos químicos (por ejemplo, glucosilación, alquilación, acetilación, amidación, fosforilación, adición de grupos sulfhidrilo y similares). La invención contempla además modificaciones que hacen que el resto de ligando sea detectable. Para este fin, pueden preverse modificaciones con un resto detectable (es decir, un resto de centellografía, radiactivo o fluorescente o un marcador colorante y similares). Dichos marcadores detectables pueden unirse al resto de ligando mediante cualquier técnica convencional y puede usarse con fines diagnósticos (por ejemplo, obtención de imágenes de células tumorales). En algunas realizaciones, la molécula compañera de unión es un antígeno (por ejemplo, un antígeno específico de célula diana, un antígeno específico de enfermedad, un antígeno que se expresa específicamente en la superficie de células diana modificadas) y el resto de ligando es un anticuerpo, un fragmento o una unidad mínima de reconocimiento del mismo (por ejemplo, un fragmento que sigue presentando una especificidad antigénica), tal como los descritos en detalle en manuales de inmunología (véase, por ejemplo, *Immunology*, tercera edición, 1993, Roitt, Brostoff y Male, ed Gambli, Mosby). El resto de ligando puede ser un anticuerpo monoclonal. Se conocen diversos anticuerpos monoclonales que se unen a muchos de estos antígenos y usando técnicas conocidas en la técnica en relación con la tecnología de anticuerpos monoclonales, pueden prepararse anticuerpos contra la mayoría de antígenos. El resto de ligando puede formar parte de un anticuerpo (por ejemplo, un fragmento Fab) o un fragmento de anticuerpo sintético (por ejemplo, scFv). En algunas realizaciones, el resto de ligando se selecciona entre fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos completos. Las funciones efectoras de los anticuerpos completos, tales como la unión a complemento, se eliminan. Los fragmentos de anticuerpo scFv y dAb pueden expresarse como una fusión con uno o más polipéptidos distintos. Las unidades mínimas de reconocimiento pueden obtenerse de la secuencia de una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del fragmento Fv. Los anticuerpos completos y los fragmentos F(ab')₂ son "bivalentes". Por "bivalente" se entiende que dichos anticuerpos y fragmentos F(ab')₂ tienen dos sitios de unión a antígeno. Por el contrario, los fragmentos Fab, Fv, scFv, dAb y las unidades mínimas de reconocimiento son monovalentes, que tienen solo un sitio de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el resto de ligando permite el direccionamiento a una célula tumoral y es capaz de reconocer y unirse a una molécula relacionada con el estado tumoral, tal como un antígeno específico de tumores, una proteína celular expresada de manera diferencial o en exceso en células tumorales o un producto génico de un virus asociado con el cáncer. Los ejemplos de antígenos específicos de tumores incluyen, pero sin limitación, MUC-1 relacionado con el cáncer de mama (Hareuven i et al., 1990, *Eur. J. Biochem* 189, 475-486), los productos codificados por los genes BRCA1 y BRCA2 mutados relacionados con los cánceres de mama y ovario (Miki et al, 1994, *Science* 226, 66-71; FuiREAL et al, 1994, *Science* 226, 120-122; Wooster et al., 1995, *Nature* 378, 789-792), APC relacionadas con el cáncer de colon (Poiakis, 1995, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 66-71), antígeno específico de próstata (PSA) relacionado con el cáncer de próstata, (Stamey et al., 1987, *New England J. Med.* 317, 909), antígeno embrionario de carcinoma (CEA) relacionado con los cánceres de colon (Schrewe et al., 1990, *Mol. Cell. Biol.* 10, 2738-2748), tirosinasa relacionada con melanomas (Vile et al, 1993, *Cancer Res.* 53, 3860-3864), receptor de hormona estimulante de melanocitos (MSH), que está altamente expresada en células de melanoma, ErbB-2 relacionada con los cánceres de mama y páncreas (Harris et al., 1994, *Gene Therapy* 1, 170-175) y alfafetoproteína relacionada con cánceres de hígado (Kanai et al., 1997, *Cancer Res.* 57, 461-465). En algunas realizaciones, el resto de ligando es un fragmento de un anticuerpo capaz de reconocer y unirse al antígeno MUC-1 y por lo tanto, de dirigirse a células tumorales positivas a MUC-1. En algunas realizaciones, el resto de ligando es el fragmento scFv del anticuerpo monoclonal SM3 que reconoce la región de repetición en tándem del antígeno MUC-1 (Bursnell et al., 1987, *Cancer Res.* 47, 5476-5482; Girling et al., 1989, *Int. J. Cancer* 43, 1072-1076; Dokurno et al., 1998, *J. Mol. Biol.* 284, 713-728). Los ejemplos de proteínas celulares expresadas de manera diferencial o en exceso en células tumorales incluyen, pero sin limitación, el receptor para interleucina 2 (IL-2) sobreexpresado en algunos tumores linfoides, GRP (péptido de liberación de gastrina) sobreexpresado en las células de carcinoma de pulmón, páncreas, próstata y tumores de estómago (Michael et al., 1995, *Gene Therapy* 2, 660-668), receptor de TNF (factor de necrosis tumoral), receptores del factor de crecimiento epidérmico, receptor de Fas, receptor de CD40, receptor de CD30, receptor de CD27, OX-40, integrinas α -v (Brooks et al, 1994, *Science* 264, 569) y receptores para ciertos factores de crecimiento angiogénicos (Hanahan, 1997, *Science* 277, 48). Basándose en estas indicaciones, se encuentra dentro del alcance de los expertos en la materia definir un resto de ligando adecuado capaz de reconocer y unirse a dichas proteínas. A modo ilustrativo, IL-2 es adecuado para que el resto de ligando se una al receptor de IL-2. En el caso de receptores que son específicos para la fibrosis y la inflamación, estos incluyen los receptores de TGFbeta o los receptores de adenosina que se han identificado anteriormente y son dianas adecuadas para las composiciones de la invención. Los marcadores de la superficie celular

para el mieloma múltiple incluyen, pero sin limitación, CD56, CD40, FGFR3, CS1, CD138, IGF1R, VEGFR y CD38 y son dianas adecuadas para las composiciones de la invención. Los restos de ligando adecuados que se unen a estos marcadores de la superficie celular incluyen, pero sin limitación, anti-CD56, anti-CD40, PRO-001, Chir-258, HuLuc63, anti-CD138-DM1, anti-IGF1R y bevacizumab.

5

Moléculas de carga

En algunas realizaciones, la molécula de carga del complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente es un ácido nucleico. En algunas realizaciones, la molécula de carga se selecciona entre el grupo que consiste en oligonucleótidos, polinucleótidos, oligo y polinucleótidos mono o bicatenarios, oligonucleótidos antisentido, diversas formas de iARN, incluyendo, por ejemplo, ARNpi, ARNhC, etc., microARN (miARN), antagomirs, ribozimas, aptámeros, ADN plasmídico, etc. y combinaciones adecuadas de uno o más de los mismos. En algunas realizaciones, la molécula de carga es una proteína, tal como, por ejemplo, una enzima o anticuerpo o una molécula pequeña. En algunas realizaciones, la nanopartícula comprende una pluralidad de moléculas de carga que comprende una combinación de ácidos nucleicos con proteínas o moléculas pequeñas. En algunas realizaciones, la combinación comprende ácidos nucleicos con proteínas o moléculas pequeñas que están unidas covalentemente entre sí. En algunas realizaciones, la combinación comprende ácidos nucleicos con proteínas o moléculas pequeñas que no están unidas covalentemente entre sí.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

"Polinucleótido", o "ácido nucleico", como se usa de manera indistinta en el presente documento, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluye ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados y/o sus análogos o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero mediante una ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. La expresión "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero que contiene al menos dos desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma mono o bicatenaria e incluye ADN y ARN. El ADN puede encontrarse en forma de, por ejemplo, moléculas antisentido, ADN plasmídico, ADN precondensado, un producto de la PCR, vectores (PAC, BAC, YAC, cromosomas artificiales), casetes de expresión, secuencias químicas, ADN cromosómico o derivados y combinaciones de estos grupos. El ARN puede estar en forma de ARNpi, ARN asimétrico de interferencia (ARNai), microARN (miARN), ARNm, ARNt, ARNr, ARN, ARN vírico (ARNv) y combinaciones de los mismos. Los ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o restos o enlaces de la cadena principal modificados, incluyendo, por ejemplo, ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico no bloqueado (UNA) y ácido nucleico zip (ZNA), que pueden ser sintéticos, de origen natural y de origen no natural y que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia. Los ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforoamidatos, metil fosfonatos, metil fosfonatos quirales, 2'-O-metil ribonucleótidos y ácidos peptidonucleicos (PNA). A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia. Salvo que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes modificadas de manera conservativa de los mismos (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNP y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, pueden lograrse sustituciones de codones degenerados generando secuencias en las que se sustituye la tercera posición de uno o más (o todos) codones seleccionados por restos de bases mixtas y/o de desoxiinosina (Batzer e al., Nucleic Acid Res., 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem., 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes, 8:91-98 (1994)). Los "nucleótidos" contienen un azúcar de desoxirribosa (ADN) o ribosa (ARN), una base y un grupo fosfato. Los nucleótidos están unidos entre sí a través de los grupos fosfato. Las "bases" incluyen purinas y pirimidinas, que incluyen adicionalmente los compuestos naturales adenina, timina, guanina, citosina, uracilo, inosina y análogos naturales y derivados sintéticos de purinas y pirimidinas, que incluyen, pero sin limitación, modificaciones que colocan nuevos grupos reactivos, tales como, pero sin limitación, aminos, alcoholes, tioles, carboxilasas y haluros de alquilo. "Oligonucleótido", como se usa en el presente documento, se refiere en general a polinucleótidos cortos generalmente sintéticos que en general, pero no necesariamente, tienen menos de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente excluyentes. La descripción anterior para los polinucleótidos es igual y completamente aplicable a los oligonucleótidos.

55

60

65

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos son oligonucleótidos monocatenarios. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos son oligonucleótidos bicatenarios. Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento pueden tener cualquiera de una serie de longitudes de hasta, pero no necesariamente, 200 nucleótidos en el caso de oligonucleótidos antisentido, iARN, ARNpi, ARNhC, ARNi, antagomirs o hasta 1000 kilobases en el caso de ADN plasmídico.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos son ARN de interferencia, tal como ARNpi y ARNhC. La expresión "ARN de interferencia" o "ARNi" o "secuencia de ARN de interferencia" se refiere a ARN monocatenario (por ejemplo, miARN maduro) o ARN bicatenario (es decir, ARN dúplex, tal como ARNpi, ARNai o pre-miARN) que es capaz de reducir o inhibir la expresión de un gen o una secuencia diana (por ejemplo, mediando la degradación o inhibiendo la traducción de ARNm que son complementarios a la secuencia de ARN de interferencia) cuando el ARN de interferencia se encuentra en la misma célula que el gen o la secuencia diana, por lo que el ARN de interferencia se refiere al ARN monocatenario que es complementario a una secuencia de ARNm diana o al ARN bicatenario formado por dos hebras

complementarias o por una hebra individual autocomplementaria. El ARN de interferencia puede tener una identidad sustancial o completa con el gen o la secuencia diana o puede comprender una región de desemparejamiento (es decir, un motivo de desemparejamiento). La secuencia del ARN de interferencia puede corresponder al gen diana de longitud completa o una subsecuencia del mismo. El ARN de interferencia incluye "ARN pequeño de interferencia" o "ARNpi", por ejemplo, ARN de interferencia de aproximadamente 15-60, 15-50 o 5-40 (dúplex) nucleótidos de longitud, más típicamente de aproximadamente 15-30, 15-25 o 19-25 (dúplex) nucleótidos de longitud y preferentemente tiene aproximadamente 20-24, 21-22 o 21-23 (dúplex) nucleótidos de longitud (por ejemplo, cada secuencia complementaria del ARNpi bicatenario tiene 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25 o 19-25 nucleótidos de longitud, preferentemente, aproximadamente 20-24, 21-22 o 21-23 nucleótidos de longitud y el ARNpi bicatenario tiene aproximadamente 15-60, 15-50, 15-40, 5-30, 5-25 o 19-25 pares de bases de nucleótidos, preferentemente aproximadamente 8-22, 9-20 o 19-21 pares de bases de longitud). Los dúplex de ARNpi pueden comprender salientes 3' de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 nucleótidos o de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 nucleótidos y extremos fosfato 5'. Los ejemplos de ARNpi incluyen, sin limitación, una molécula de polinucleótido bicatenaria ensamblada a partir de dos moléculas de cadenas separadas, en donde una hebra es la hebra con sentido y la otra es la hebra antisentido complementaria; una molécula de polinucleótido bicatenario ensamblada a partir de una molécula monocatenaria, donde se enlazan las secuencias con sentido y antisentido por un enlazador basado en ácido nucleico o no basado en ácido nucleico; una molécula de polinucleótido bicatenario con una estructura secundaria en horquilla que tiene regiones con sentido y antisentido autocomplementarias; y una molécula de polinucleótido monocatenario con dos o más estructuras de bucle y un tallo que tiene regiones con sentido y antisentido autocomplementarias, donde el polinucleótido circular puede procesarse *in vivo* o *in vitro* para generar una molécula de ARNpi bicatenaria activa. Preferentemente, los ARNpi se sintetizan químicamente. También puede generarse ARNpi mediante la escisión de un ARNbc más largo (por ejemplo, un ARNbc de más de aproximadamente 25 nucleótidos de longitud) con la RNasa III de *E. coli* o Dicer. Estas enzimas procesan el ARNbc en ARNpi biológicamente activo (véase, por ejemplo, Yang et al., Proc Natl. Acad. Set. USA, 99:9942-9947 (2002); Calegari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 14236 (2002); Byrom et al., Ambion TeehNotes, 10(1):4-6 (2003); Kawasaki et al., Nucleic Acids Res., 3 1:981 - 987 (2003); Knight et al., Science, 293:2269-2271 (2001); and Robertson et al., J. Biol. Chem., 243:82 (1968)). Preferentemente, los ARNbc tienen de al menos 50 nucleótidos a aproximadamente 100, 200, 300, 400 o 500 nucleótidos de longitud. Un ARNbc puede tener una longitud de 1000, 1500, 2000, 5000 nucleótidos o más. El ARNbc puede codificar un transcrito génico completo o un transcrito génico parcial. En ciertos casos, el ARNpi puede estar codificado por un plásmido (por ejemplo, transcrito como secuencias que se pliegan automáticamente en dúplex con bucles en horquilla). Un ARN pequeño en horquilla o un ARN en horquilla corto (ARNhc) es una secuencia de ARN que produce un giro en horquilla estrecho que puede usarse para silenciar la expresión génica mediante interferencia de ARN. La estructura de horquilla del ARNhc se escinde por la maquinaria celular en ARNpi, que después se une al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Este complejo se une a y escinde los ARNm que coinciden con el ARNpi unido a los mismos. La longitud adecuada del ARN de interferencia es de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 nucleótidos o de 10-50 nucleótidos o pares de bases o de 15-30 nucleótidos o pares de bases. En algunas realizaciones, el ARN de interferencia es sustancialmente complementario (tal como al menos aproximadamente un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más idéntico) al gen diana correspondiente. En algunas realizaciones, el ARN de interferencia se modifica, por ejemplo, incorporando nucleótidos de origen no natural.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos son ARN antisentido bicatenarios. La longitud adecuada del ARN de interferencia es de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 nucleótidos o de 10-50 nucleótidos o pares de bases o de 15-30 nucleótidos o pares de bases. En algunas realizaciones, el ARN de interferencia es sustancialmente complementario (tal como al menos aproximadamente un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más idéntico) al gen diana correspondiente. En algunas realizaciones, el ARN antisentido se modifica, por ejemplo, incorporando nucleótidos de origen no natural.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico es un ARN de interferencia, tal como un ARNpi, que se dirige específicamente a una molécula de ARN, tal como un ARNm, que codifica una proteína implicada en una enfermedad, tal como cáncer. En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer, tal como un tumor sólido o una neoplasia maligna hematológica y el ARN de interferencia se dirige a ARN que codifica una proteína implicada en el cáncer, tal como una proteína implicada en la regulación de la progresión del cáncer.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico es un ARN de interferencia, tal como un ARNpi, que se dirige específicamente a una molécula de ARN, tal como un ARNm, que codifica una proteína implicada en la regulación negativa de una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, el ARN de interferencia se dirige a ARNm que codifica una molécula coestimuladora negativa. En algunas realizaciones, la molécula coestimuladora negativa incluye, por ejemplo, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3 y CTLA-4.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos son miARN. Un microARN (abreviado como miARN) es una molécula de ácido ribonucleico (ARN) corta que se encuentra en células eucariotas. Una molécula de microARN tiene muy pocos nucleótidos (una media de 22) en comparación con otros ARN. Los miARN son reguladores postraduccionales que se unen a secuencias complementarias en transcritos de ARN mensajero diana (ARNm), dando normalmente como resultado la represión de la degradación de la diana y silenciamiento génico. El genoma humano puede codificar más de 1000 miARN, que pueden dirigirse a aproximadamente un 60 % de los genes de mamífero y son abundantes en muchos tipos celulares humanos. La longitud adecuada de los miARN de aproximadamente 5 a aproximadamente

200 nucleótidos o de 0-50 nucleótidos o pares de bases o de 15-30 nucleótidos o pares de bases. En algunas realizaciones, el miARN es sustancialmente complementario (tal como al menos aproximadamente un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más idéntico) al gen diana correspondiente. En algunas realizaciones, el ARN antisentido se modifica, por ejemplo, incorporando nucleótidos de origen no natural.

5 En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos son ADN plasmídico o fragmentos de ADN (por ejemplo, fragmentos de ADN con longitudes de hasta aproximadamente 1000 pb). Además, el ADN plasmídico o los fragmentos de ADN pueden estar hipermetilados o hipometilados. En algunas realizaciones, el ADN plasmídico o los fragmentos de ADN codifican uno o más genes y pueden contener los elementos regulatorios necesarios para la expresión de dichos uno
10 o más genes. En algunas realizaciones, el ADN plasmídico o los fragmentos de ADN pueden comprender uno o más genes que codifican un marcador de selección, que permite mantener el ADN plasmídico o el fragmento de ADN en una célula hospedadora adecuada.

15 En algunas realizaciones, el ADN plasmídico comprende una secuencia de ADN que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une específicamente a un antígeno diana, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. Los CAR se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos n.º 8.822.647, la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2015/0051266, el documento WO 2014/127261 y el documento WO2014099671, cuyas divulgaciones se incorporan específicamente al presente documento por referencia en su totalidad. En algunas realizaciones, el
20 antígeno diana es un antígeno asociado específicamente con (tal como expresado por) una célula cancerosa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ADN plasmídico comprende una secuencia de ADN que codifica un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une específicamente a un antígeno asociado con el cáncer, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. En algunas realizaciones, el antígeno asociado con el cáncer está asociado con un tumor sólido. En algunas realizaciones, el antígeno asociado con el
25 cáncer está asociado con una neoplasia maligna hematológica, tal como una neoplasia maligna de linfocitos B o leucemia. En algunas realizaciones, el antígeno diana incluye, por ejemplo, CD19, CD20, CD28, OX40, GITR, CD137, CD27, HVEM, BCMA, CD70, CD74, CD38, CD138, CD33, Lewis-Y, CD123, CD44v6 y CS1.

30 Por lo tanto, en algunas realizaciones, el ADN plasmídico comprende una secuencia de ADN que codifica un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une específicamente a un antígeno asociado con el cáncer asociado con una neoplasia maligna hematológica, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. En algunas realizaciones, la neoplasia maligna hematológica es una neoplasia maligna de linfocitos B y el antígeno asociado con el cáncer incluye, por ejemplo, CD19, CD20, CD28, OX40, GITR, CD137, CD27 y HVEM. En algunas realizaciones, la neoplasia maligna hematológica es leucemia, tal como leucemia mieloide aguda y el
35 antígeno asociado con el cáncer incluye, por ejemplo, BCMA, CD70, CD74, CD38, CD138, CD33, Lewis-Y, CD123, CD44v6 y CS1.

Composiciones

40 En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica que comprende un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente y un diluyente, excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la concentración del complejo o la nanopartícula en la
45 composición es de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 mM, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 25 nM a aproximadamente 25 mM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 1 mM, de aproximadamente 500 nM a aproximadamente 750 µM, de aproximadamente 750 nM a aproximadamente 500 µM, de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 250 µM, de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 200 µM y de
50 aproximadamente 50 µM a aproximadamente 150 µM.

La expresión "diluyente, excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos y similares, compatibles con la administración a seres humanos u otros hospedadores vertebrados. Normalmente, un diluyente, excipiente y/o
55 vehículo farmacéuticamente aceptable es un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable aprobado por una agencia reguladora de un gobierno federal o estatal u otra agencia reguladora o listado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, incluyendo seres humanos, así como mamíferos no humanos. La expresión "diluyente, excipiente y/o vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra la composición farmacéutica. Dichos diluyentes, excipientes
60 y/o vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos procedentes del petróleo o de origen animal, vegetal o sintético. Pueden emplearse agua, soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como diluyentes, excipientes y/o vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los diluyentes y/o excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede
65 contener cantidades menores de agentes humectantes, de volumen y emulsionantes o agentes tamponadores del pH.

Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, formulaciones de liberación sostenida y similares. Se describen ejemplos de diluyentes, excipientes y/o vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. La formulación ha de ser adecuada para el modo de administración. El diluyente, excipiente y/o vehículo adecuado será evidente para los expertos en la materia y dependerá en gran medida de la vía de administración.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente se formula para administración intravenosa, intratumoral, intraarterial, tópica, intraocular, oftálmica, intracraneal, intratecal, intravesicular, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intranasal, intratraqueal, pulmonar, intracavidad u oral.

En algunas realizaciones, las dosis de las composiciones farmacéuticas de la presente invención que se ha observado que son adecuadas para el tratamiento de sujetos humanos o mamíferos se encuentran en el intervalo de 0,001 mg/kg - 100 mg/kg de la molécula de carga. En algunas realizaciones, los intervalos de dosis son de 0,1-20 mg/kg. En algunas realizaciones, los intervalos de dosis se encuentran en el intervalo de 0,5-10 mg/kg. En algunas realizaciones, la pauta de administración de la composición farmacéutica a un individuo varía de una sola administración que supone el tratamiento completo a administración diaria. En algunas realizaciones, la administración es una vez cada 3-30 días. En algunas realizaciones, la administración es una vez cada 4-7 días.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el vehículo farmacéuticamente aceptable es un azúcar o una proteína. En algunas realizaciones, el azúcar se selecciona entre el grupo que consiste en sacarosa, glucosa, manitol y una combinación de los mismos y está presente en la composición farmacéutica a una concentración de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 20 %. En algunas realizaciones, el azúcar es sacarosa. En algunas realizaciones, el azúcar es glucosa. En algunas realizaciones, el azúcar es manitol. En algunas realizaciones, la proteína es albúmina. En algunas realizaciones, la albúmina es seroalbúmina humana. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica está liofilizada.

Métodos de preparación

En algunas realizaciones, se proporciona un método para preparar un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente que comprende a) combinar una composición que comprende un péptido de ADGN como se ha descrito anteriormente con una composición que comprende una molécula de carga como se ha descrito anteriormente para formar una mezcla y b) incubar la mezcla para formar el complejo o la nanopartícula. En algunas realizaciones, la composición que comprende el péptido de ADGN es una solución madre que comprende el péptido de ADGN a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 2,5 mg/ml, de aproximadamente 0,75 mg/ml a aproximadamente 1,5 mg/ml y aproximadamente 1 mg/ml. En algunas realizaciones, la solución madre que comprende el péptido de ADGN se somete a ultrasonidos durante de aproximadamente 2 min a aproximadamente 20 min, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 5 min a aproximadamente 15 min y aproximadamente 10 min. En algunas realizaciones, la molécula de carga es un ácido nucleico y la composición que comprende la molécula de carga es una solución madre que comprende un ácido nucleico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es un oligonucleótido como se ha descrito anteriormente y la solución madre que comprende un ácido nucleico comprende el oligonucleótido a una concentración de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 20 μ M, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 15 μ M, de aproximadamente 3 μ M a aproximadamente 10 μ M, de aproximadamente 4 μ M a aproximadamente 8 μ M y aproximadamente 5 μ M. En algunas realizaciones, la solución madre que comprende un oligonucleótido se formula en agua. En algunas realizaciones, el agua es agua destilada. En algunas realizaciones, la solución madre que comprende un oligonucleótido se formula en un tampón. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es un plásmido y la solución madre que comprende el ácido nucleico comprende el plásmido a una concentración de aproximadamente 20 μ M a aproximadamente 500 μ M, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 30 μ M a aproximadamente 400 μ M, de aproximadamente 40 μ M a aproximadamente 300 μ M, de aproximadamente 50 μ M a aproximadamente 200 μ M, de aproximadamente 75 μ M a aproximadamente 150 μ M y aproximadamente 100 μ M. En algunas realizaciones, la solución madre que comprende un plásmido se formula en agua. En algunas realizaciones, el agua es agua destilada. En algunas realizaciones, la solución madre que comprende un plásmido se formula en un tampón. En algunas realizaciones, el tampón es cualquier tampón conocido en la técnica para almacenar un plásmido, incluyendo, por ejemplo, un tampón que comprende Tris y EDTA, en donde el Tris se encuentra a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 70 mM, de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 60 mM y aproximadamente 50 mM y en donde el EDTA se encuentra a una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1 mM, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 0,8 mM, de aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 0,7 mM, de aproximadamente 0,4 mM a aproximadamente 0,6 mM y aproximadamente 0,5 mM. En algunas realizaciones, el método comprende combinar la solución madre que comprende un péptido de ADGN y la solución madre que comprende un ácido nucleico en un medio acuoso para formar una mezcla. En algunas realizaciones, el medio acuoso es agua, incluyendo, por ejemplo, agua destilada. En algunas realizaciones, el medio acuoso es un tampón, incluyendo, por ejemplo, PBS, Tris o cualquier tampón conocido en la técnica para estabilizar complejos de

nucleoproteína. En algunas realizaciones, la relación molar del péptido de ADGN al ácido nucleico en la mezcla es de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 80:1, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 40:1 y aproximadamente cualquiera de 1:2, 1:1, 2:1, 5:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1 y 50:1. En algunas realizaciones, la mezcla se incuba para formar el complejo o nanopartícula durante de aproximadamente 10 min a 60 min, incluyendo, por ejemplo, durante aproximadamente cualquiera de 20 min, 30 min, 40 min y 50 min, una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 50 °C, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 5 °C, de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 10 °C, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 15 °C, de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 20 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 30 °C, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 35 °C, de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 40 °C, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 45 °C y de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 50 °C, por tanto dando como resultado una solución madre que comprende el complejo o la nanopartícula. En algunas realizaciones, la solución madre que comprende el complejo o nanopartícula permanece estable durante al menos aproximadamente tres semanas, incluyendo, por ejemplo, durante al menos aproximadamente cualquiera de 6 semanas, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses y 6 meses a 4 °C. En algunas realizaciones, la solución madre que comprende el complejo o la nanopartícula se liofiliza en presencia de un vehículo. En algunas realizaciones, el vehículo es un azúcar, incluyendo, por ejemplo, sacarosa, glucosa, manitol y combinaciones de los mismos y está presente en la solución madre que comprende el complejo o la nanopartícula a de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 20 %, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente un 7,5 % a aproximadamente un 17,5 %, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 15 % y aproximadamente un 12,5 %, en peso por volumen. En algunas realizaciones, el vehículo es una proteína, incluyendo, por ejemplo, albúmina, tal como seroalbúmina humana.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para preparar una nanopartícula que comprende un núcleo y al menos una capa adicional como se ha descrito anteriormente que comprende a) combinar una composición que comprende una molécula de ensamblaje como se ha descrito anteriormente con una composición que comprende una molécula de carga como se ha descrito anteriormente para formar una primera mezcla, b) incubar la primera mezcla para formar el núcleo de la nanopartícula, c) combinar la mezcla de b) con una composición que comprende un péptido penetrante en células para formar una segunda mezcla y d) incubar la segunda mezcla para formar una nanopartícula que comprende un núcleo y al menos una capa adicional. En algunas realizaciones, el método comprende e) combinar una composición que comprende una nanopartícula que comprende un núcleo y al menos una capa adicional y una composición que comprende un péptido penetrante en células para formar una tercera mezcla y f) incubar la tercera mezcla para formar una nanopartícula que comprende un núcleo y al menos dos capas adicionales. Ha de apreciarse que el método puede adaptarse para formar una nanopartícula que comprende números crecientes de capas. En algunas realizaciones, la molécula de ensamblaje es un péptido de ADGN como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la molécula de ensamblaje no es un péptido de ADGN como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el péptido penetrante en células es un péptido de ADGN como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el péptido penetrante en células no es un péptido de ADGN como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la composición que comprende la molécula de ensamblaje o el péptido penetrante en células es una solución madre que comprende la molécula de ensamblaje o el péptido penetrante en células a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 2,5 mg/ml, de aproximadamente 0,75 mg/ml a aproximadamente 1,5 mg/ml y aproximadamente 1 mg/ml. En algunas realizaciones, la solución madre que comprende la molécula de ensamblaje o el péptido penetrante en células se somete a ultrasonidos durante de aproximadamente 2 min a aproximadamente 20 min, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 5 min a aproximadamente 15 min y aproximadamente 10 min. En algunas realizaciones, la molécula de carga es un ácido nucleico y la composición que comprende la molécula de carga es una solución madre que comprende un ácido nucleico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es un oligonucleótido como se ha descrito anteriormente y la solución madre que comprende un ácido nucleico comprende el oligonucleótido a una concentración de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 20 µM, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 15 µM, de aproximadamente 3 µM a aproximadamente 10 µM, de aproximadamente 4 µM a aproximadamente 8 µM y aproximadamente 5 µM. En algunas realizaciones, la solución madre que comprende un oligonucleótido se formula en agua. En algunas realizaciones, el agua es agua destilada. En algunas realizaciones, la solución madre que comprende un oligonucleótido se formula en un tampón. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es un plásmido y la solución madre que comprende el ácido nucleico comprende el plásmido a una concentración de aproximadamente 20 µM a aproximadamente 500 µM, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 30 µM a aproximadamente 400 µM, de aproximadamente 40 µM a aproximadamente 300 µM, de aproximadamente 50 µM a aproximadamente 200 µM, de aproximadamente 75 µM a aproximadamente 150 µM y aproximadamente 100 µM. En algunas realizaciones, la solución madre que comprende un plásmido se formula en agua. En algunas realizaciones, el agua es agua destilada. En algunas realizaciones, la solución madre que comprende un plásmido se formula en un tampón. En algunas realizaciones, el tampón es cualquier tampón conocido en la técnica para almacenar un plásmido, incluyendo, por ejemplo, un tampón que comprende Tris y EDTA, en donde el Tris se encuentra a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 70 mM, de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 60 mM y aproximadamente 50 mM y en donde el EDTA se encuentra a una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1 mM, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 0,8 mM, de aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 0,7 mM, de

aproximadamente 0,4 mM a aproximadamente 0,6 mM y aproximadamente 0,5 mM. En algunas realizaciones, la combinación se lleva a cabo en un medio acuoso para formar una mezcla. En algunas realizaciones, el medio acuoso es agua, incluyendo, por ejemplo, agua destilada. En algunas realizaciones, el medio acuoso es un tampón, incluyendo, por ejemplo, PBS, Tris o cualquier tampón conocido en la técnica para estabilizar complejos de nucleoproteína. En algunas realizaciones, la relación molar del péptido penetrante en células al ácido nucleico en la mezcla es de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 80:1, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 40:1 y aproximadamente cualquiera de 1:2, 1:1, 2:1, 5:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1 y 50:1. En algunas realizaciones, la mezcla se incuba para formar la nanopartícula durante de aproximadamente 10 min a 60 min, incluyendo, por ejemplo, durante aproximadamente cualquiera de 20 min, 30 min, 40 min y 50 min, una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 45 °C, incluyendo, por ejemplo, aproximadamente a cualquiera de 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C y 44 °C, por tanto dando como resultado una solución madre que comprende la nanopartícula. En algunas realizaciones, la solución madre que comprende la nanopartícula permanece estable durante al menos aproximadamente tres semanas a 4 °C. En algunas realizaciones, la solución madre que comprende la nanopartícula se liofiliza en presencia de un vehículo. En algunas realizaciones, el vehículo es un azúcar, incluyendo, por ejemplo, sacarosa, glucosa, manitol y combinaciones de los mismos y está presente en la solución madre que comprende el complejo o la nanopartícula a de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 20 %, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente un 7,5 % a aproximadamente un 17,5 %, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 15 % y aproximadamente un 12,5 %, en peso por volumen. En algunas realizaciones, el vehículo es una proteína, incluyendo, por ejemplo, albúmina, tal como seroalbúmina humana.

En algunas realizaciones, para una composición estable que comprende un complejo o nanopartícula de la invención, el diámetro medio del complejo no cambia en más de aproximadamente un 10 % y el índice de polidispersidad no cambia en más de aproximadamente un 10 %.

25

Métodos de uso

En algunas realizaciones, se proporciona un método para tratar una enfermedad en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende una o más moléculas de carga útiles en el tratamiento de la enfermedad. En algunas realizaciones, la enfermedad que se va a tratar incluye, pero sin limitación, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica modula la expresión de uno o más genes. En algunas realizaciones, los uno o más genes codifican proteínas que incluyen, pero sin limitación, factores de crecimiento y citocinas, receptores de la superficie celular, moléculas de señalización y cinasas, factores de transcripción y otros moduladores de la transcripción, reguladores de la expresión y modificación de proteínas y reguladores de la apoptosis y la metástasis. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además uno o más complejos o nanopartículas adicionales como se han descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de una o más composiciones farmacéuticas adicionales que comprenden uno o más complejos o nanopartículas adicionales como se han descrito anteriormente.

La "modulación" de la actividad o expresión, como se usa en el presente documento, significa regular o alterar el estado o los números de copias de un gen o ARNm o cambiar la cantidad de producto génico, tal como una proteína que se produce. En algunas realizaciones, la molécula de carga inhibe la expresión de un gen diana. En algunas realizaciones, la modulación (tal como inhibición) se produce a un nivel postraduccional. En algunas realizaciones, la molécula de carga inhibe la expresión del gen o producto génico en al menos aproximadamente cualquiera de un 0 %, 20 %, 30 %, 40 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %. En algunas realizaciones, tal como en el caso del suministro de plásmidos, la molécula de carga puede aumentar la expresión de un gen o producto génico en al menos aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %.

En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, los uno o más genes incluyen, pero sin limitación, EGF, VEGF, FGF, HGF, HDGF, IGF, PDGF, TGF- α , TGF- β , TNF- α , wnt, ER, PR, Her2, Her3, receptor de angiopoyetina, EGFR, FGFR, HGFR, HDGFR, IGFR, KGFR, MSFR, PDGFR, TGFR, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, receptores de la familia de Frizzled (FZD-1 a 10), smoothened, patched, CXCR4, KRAS, NRAS, RAF, MEK, MEKK, MAPK, MKK, ERK, JNK, JAK, PKA, PKC, PI3K, Akt, mTOR, Raptor, Rictor, MLST8, PRAS40, DEPTOR, MSIN1, S6 cinasa, PDK1, BRAF, FAK, Src, Fyn, Shc, GSK, IKK, PLK-1, cinasas dependientes de ciclina (Cdk1 a 13), cinasas activantes de CDK, ALK/Met, Syk, BTK, Bcr-Abl, RET, β -catenina, Mcl-1, PKN, ATF-2, Chop, c-Jun, c-Myc, DPC4, Elk-1, Ets1, Max, MEF2C, NFAT4, Sap1a, STAT, Tal, p53, CREB, Myc, NF- κ B, HDAC, HIF-1 α , RRM2, ubiquitina ligasa, LMP2, LMP7, MECL-1, XIAP, Bcl-2, osteopontina, SPARC, MMP-2, MMP-9, uPAR, IL-2, IL-12, interferón gamma, GM-CSF, B7-1, caspasa-9, p53, MUC-1, MDR-1, HLA-B7/Beta 2-Microglobulina, Her2, Hsp27, timidina cinasa y MDA-7, GLI1, CTNBN1, eIF5A, DDX3X mutante, hexocinasa II, histona metiltransferasa EZH2, ARK5, ALK, MUC1, HMGA2, IRF1, RPN13, HDAC11, Rad51, Spry2, mir-146a, mir-146b, survivina, MDM2, MCL1, CMYC, XBP1 (cortado y empalmado o sin cortar y empalmar), SLAMF7, CS1, Erbb4, Cxcr4 (macroglubulinemia de Waldenström), Myc, Bcl2, Prdx1 y Prdx2 (linfoma de Burkitt), Bcl6, Idh1, Idh2, Smad, Ccnd2, ciclina d1-2, B7-h1 (pdl-1), Pyk2, nucleocápside de

65

RSV, Pre-gen/Pre-C, Pre-S1, Pre-S2/S,X, secuencias conservadas de VHB, Tat de VIH, ARN de TAR de VIH, CCR5 humano, miR-122, polimerasa L de EBOV, VP24, VP40, GP/sGP, VP30, VP35, NPC1, TIM-1, Transtiretina, MDS1-EV11, PRDM16, SETBP1, β -globina, LPL, queratina K6A, queratina K6B, queratina 16, queratina 17, p53, receptores β -2 adrenérgicos (ADRB2), TRPV1, VEGF, VEGFR, HIF-1, caspasa-2, SPARC, CTGF, TGF β 1, receptor 1 de TGF β , receptor 2 de TGF β , receptor 3 de TGF β , VEGF, angiotensina II, TIMP, HSP47, trombospondina, CCN1, LOXL2, MMP2, MMP9, CCL2, receptor A2A de adenosina, receptor A2B de adenosina, adenililo ciclasa, Smad 3, Smad 4, Smad 7, SOX9, arrestina, PDCD4, PAI-1, NF- κ B y PARP-1.

En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la enfermedad que se va a tratar es cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es un tumor sólido y la composición farmacéutica modula la expresión de uno o más genes que codifican proteínas, incluyendo, pero sin limitación, factores de crecimiento y citocinas, receptores de la superficie celular, moléculas de señalización y cinasas, factores de transcripción y otros moduladores de la transcripción, reguladores de la expresión y modificación de proteínas y reguladores de la apoptosis y la metástasis. En algunas realizaciones, los factores de crecimiento o citocinas incluyen, pero sin limitación, EGF, VEGF, FGF, HGF, HDGF, IGF, PDGF, TGF- α , TGF- β , TNF- α y wnt. En algunas realizaciones, los receptores de la superficie celular incluyen, pero sin limitación, ER, PR, Her2, Her3, receptor de angiopoyetina, EGFR, FGFR, HGFR, HDGFR, IGFR, KGFR, MSFR, PDGFR, TGF β , VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, receptores de la familia de Frizzled (FZD-1 a 10), smoothened, patched y CXCR4. En algunas realizaciones, las moléculas de señalización o cinasas incluyen, pero sin limitación, KRAS, NRAS, RAF, MEK, MEKK, MAPK, MKK, ERK, JNK, JAK, PKA, PKC, PI3K, Akt, mTOR, Raptor, Rictor, MLST8, PRAS40, DEPTOR, MSIN1, S6 cinasa, PDK1, BRAF, FAK, Src, Fyn, Shc, GSK, IKK, PLK-1, cinasas dependientes de ciclina (Cdk1 a 13), cinasas activantes de CDK, ALK/Met, Syk, BTK, Bcr-Abl, RET, β -catenina, Mcl-1 y PKN3. En algunas realizaciones, los factores de transcripción u otros moduladores de la transcripción incluyen, pero sin limitación, ATF-2, Chop, c-Jun, c-Myc, DPC4, Elk-1, Ets1, Max, MEF2C, NFAT4, Sap1a, STAT, Tal, p53, CREB, Myc, NF- κ B, HDAC, HIF-1 α y RRM2. En algunas realizaciones, los reguladores de la expresión o modificación de proteínas incluyen, pero sin limitación, ubiquitina ligasa, LMP2, LMP7 y MECL-1. En algunas realizaciones, los reguladores de la apoptosis o la metástasis incluyen, pero sin limitación, XIAP, Bcl-2, osteopontina, SPARC, MMP-2, MMP-9, uPAR.

En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la enfermedad que se va a tratar es cáncer, en donde el cáncer es un tumor sólido y la composición farmacéutica comprende un ácido nucleico que codifica una o más proteínas implicadas en el desarrollo y/o la progresión tumoral. En algunas realizaciones, las una o más proteínas implicadas en el desarrollo y/o la progresión tumoral se seleccionan entre el grupo que consiste en IL-2, IL-12, interferón gamma, GM-CSF, B7-1, caspasa-9, p53, MUC-1, MDR-1, HLA-B7/Beta 2-Microglobulina, Her2, Hsp27, timidina cinasa y MDA-7.

En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la enfermedad que se va a tratar es cáncer, en donde el cáncer es una neoplasia maligna hematológica y la composición farmacéutica modula la expresión de uno o más genes que codifican proteínas implicadas en el desarrollo y/o la progresión de la neoplasia maligna hematológica. En algunas realizaciones, las proteínas implicadas en el desarrollo y/o la progresión de la neoplasia maligna hematológica incluyen, pero sin limitación, GLI1, CTNNB1, eIF5A, DDX3X mutante, hexocinasa II, histona metiltransferasa EZH2, ARK5, ALK, MUC1, HMGA2, IRF1, RPN13, HDAC11, Rad51, Spry2, mir-146a, mir-146b, survivina, MDM2, MCL1, CMYC, XBP1 (cortado y empalmado o sin cortar y empalmar), SLAMF7, CS1, Erbb4, Cxcr4 (macroglubulinemia de Waldenström), Myc, Bcl2, Prdx1 y Prdx2 (linfoma de Burkitt), Bcl6, Idh1, Idh2, Smad, Ccnd2, ciclina d1-2, B7-h1 (pdl-1) y Pyk2.

En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la enfermedad que se va a tratar es una enfermedad vírica infecciosa y la composición farmacéutica modula la expresión de uno o más genes que codifican proteínas implicadas en el desarrollo y/o la progresión de la enfermedad vírica infecciosa. En algunas realizaciones, las proteínas implicadas en el desarrollo y/o la progresión de la enfermedad vírica infecciosa incluyen, pero sin limitación, nucleocápside de RSV, Pre-gen/Pre-C, Pre-S1, Pre-S2/S,X, secuencias conservadas de VHB, Tat de VIH, ARN de TAR de VIH, CCR5 humano, miR-122, polimerasa L de EBOV, VP24, VP40, GP/sGP, VP30, VP35, NPC1 y TIM-1.

En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la enfermedad que se va a tratar es una enfermedad hereditaria y la composición farmacéutica modula la expresión de uno o más genes que codifican proteínas implicadas en el desarrollo y/o la progresión de la enfermedad hereditaria. En algunas realizaciones, las proteínas implicadas en el desarrollo y/o la progresión de la enfermedad hereditaria incluyen, pero sin limitación, Transtiretina, MDS1-EV11, PRDM16, SETBP1, β -globina y LPL.

En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la enfermedad que se va a tratar es una enfermedad del envejecimiento o degenerativa y la composición farmacéutica modula la expresión de uno o más genes que codifican proteínas implicadas en el desarrollo y/o la progresión de la enfermedad del envejecimiento o degenerativa. En algunas realizaciones, las proteínas implicadas en el desarrollo y/o la progresión de la enfermedad del envejecimiento o degenerativa incluyen, pero sin limitación, queratina K6A, queratina K6B, queratina 16, queratina 17, p53, receptores β -2 adrenérgicos (ADRB2), TRPV1, VEGF, VEGFR, HIF-1 y caspasa-2.

En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la enfermedad que se va a tratar es una enfermedad

fibrótica o inflamatoria y la composición farmacéutica modula la expresión de dos o más genes que codifican proteínas implicadas en el desarrollo y/o la progresión de la enfermedad fibrótica o inflamatoria. En algunas realizaciones, las proteínas implicadas en el desarrollo y/o la progresión de la enfermedad fibrótica o inflamatoria se seleccionan entre el grupo que consiste en SPARC, CTGF, TGF β 1, receptor 1 de TGF β , receptor 2 de TGF β , receptor 3 de TGF β , VEGF, angiotensina II, TIMP, HSP47, trombospondina, CCN1, LOXL2, MMP2, MMP9, CCL2, receptor A2A de adenosina, receptor A2B de adenosina, adenililo ciclasa, Smad 3, Smad 4, Smad 7, SOX9, arrestina, PDCD4, PAI-1, NF- κ B y PARP-1.

En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la composición farmacéutica modula la expresión de uno o más miARN implicados en una enfermedad. En algunas realizaciones, la enfermedad incluye, pero sin limitación, hepatitis B, hepatitis C, hígado poliquístico y enfermedad renal, cáncer, enfermedad cardiovascular, insuficiencia cardíaca, hipertrofia cardíaca, enfermedad del neurodesarrollo, síndrome de X frágil, síndrome de Rett, síndrome de Down, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, esquizofrenia, enfermedad inflamatoria, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, psoriasis y enfermedad muscular esquelética. En algunas realizaciones, los uno o más miARN incluyen, pero sin limitación, miR-122, miR-21, miR-155, miR-23 y miR-191, miR-205, miR-145, miR-10b y miR-125b, miR-200a, miR-200c y miR-141, miR-199a, miR-140, miR-145 y miR125bl, miR-205, miR155, miR 200a, 200b, 200c, miR-193a, 193b, miR-let 7g, miR-21, miR-20a, familia de miR-17-19, miR 31, miR 135, miR-181b y miR 200c, miR-34, miR-let7, miR 143, miR 145, miR-133b, miR-126, Has-miR-191, 199a, miR 155, miR-17-5p, miR-173p, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a y miR-92a-1, miR-21, miR 150, miR-155, miR-15a, miR16, miR-29, miR143, miR-45, miR-30d, miR-let 7a, miR-181a, miR-1, miR-16, miR-27b, miR-30d, miR-126, miR-133, miR-143, la familia de let-7, miR-208, miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-195, miR-199a, miR-214, miR-194, miR-192, miR-200c, miR-203, miR-106b-25, miR-15b, miR-16, has-mir-21 y has-mir-205, miR-17-92, has-mir-126□, miR-let 7, hsa-let-7a-2, let-7f-1, miR-2 23, miR-26b, miR-221, miR-103-1, miR-185, miR-23 b, miR-203, miR 17-5p, miR-23, miR-205, miR-29c, miR-26a, miR-30c, miR-30e-5p, miR-146 b, miR-221, miR-222, miR-181b, miR-155, miR-224, miR-30d, miR-125b, miR-26a, miR-30a-5p, miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-195, miR-199a, miR-214, miR-99a, let-7c, miR-125b-2, miR-155 y miR-802, miR-9, miR-128a, miR-125b, miR-155, miR-146, miR-189, miR-61, miR-78, miR-21, miR-142-3p, miR 342, miR-299-3p, miR-198, miR-298, miR-196a, miR-17-5p, miR-409-3p, miR-141, miR-383, miR-112, miR-184, miR-203, miR-132, miR-381, miR-382, miR-107, miR-103 y miR-100.

En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la composición farmacéutica se administra al individuo por cualquiera de administración intravenosa, intratumoral, intraarterial, tópica, intraocular, oftálmica, intracraneal, intratecal, intravesicular, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intranasal, intratraqueal, pulmonar, intracavidad u oral.

En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el individuo es un mamífero. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar una molécula en una célula que comprende poner en contacto la célula con un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende la molécula. En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, la célula es una célula inmunitaria, tal como un granulocito, un mastocito, un monocito, una célula dendrítica, un linfocito B, un linfocito T o una célula citolítica natural. En algunas realizaciones, la célula es un linfocito T procedente de sangre periférica, un linfocito T de memoria central, un linfocito T procedente de sangre de cordón o una célula madre hematopoyética u otra célula precursora. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, la célula es un fibroblasto. En algunas realizaciones, la molécula es una molécula de carga como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la molécula de carga se selecciona entre el grupo que consiste en ácidos nucleicos, polipéptidos y moléculas pequeñas. En algunas realizaciones, la molécula de carga es útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar un ácido nucleico en una célula que comprende poner en contacto la célula con un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende el ácido nucleico y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos X₁KWRSX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 1), en donde X₁ es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X₂-X₈ son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X₁ es β A, S o está ausente, X₂ es A o V, X₃ es G o L, X₄ es W o Y, X₅ es V o S, X₆ es R, V o A, X₇ es S o L y X₈ es W o Y. En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende la secuencia de aminoácidos de KWSRAGRWRLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 2), KWSRSLYRWRLWRSWSR (SEQ ID NO: 3) o KWSRSLYRWRLWRSALYSR (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar del ácido nucleico al péptido de ADGN en el complejo o la nanopartícula es de

aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*.

5 En algunas realizaciones, la célula es una célula inmunitaria, tal como un granulocito, un mastocito, un monocito, una célula dendrítica, un linfocito B, un linfocito T o una célula citolítica natural. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, la célula es un fibroblasto. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ARN, tal como ARNpi. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ADN, tal como ADN plasmídico. En algunas realizaciones, el plásmido codifica un producto terapéutico o un producto útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el plásmido codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar un ARNpi en una célula que comprende poner en contacto la célula con un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende el ARNpi y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos X₁KWRSX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 1), en donde X₁ es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X₂-X₈ son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X₁ es βA, S o está ausente, X₂ es A o V, X₃ es G o L, X₄ es W o Y, X₅ es V o S, X₆ es R, V o A, X₇ es S o L y X₈ es W o Y. En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende la secuencia de aminoácidos de KWSAGWRWRLWVRVRSWSR (SEQ ID NO: 2), KWSALYRWRLWRSRSWSR (SEQ ID NO: 3) o KWSALYRWRLWRSALYSR (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar del ARNpi al péptido de ADGN en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*.

25 En algunas realizaciones, la célula es una célula inmunitaria, tal como un granulocito, un mastocito, un monocito, una célula dendrítica, un linfocito B, un linfocito T o una célula citolítica natural. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, la célula es un fibroblasto. En algunas realizaciones, el ARNpi es útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el suministro del ARNpi en la célula da como resultado la expresión reducida de una diana en la célula. En algunas realizaciones, se reduce la expresión de la diana en al menos aproximadamente un 30 % (tal como en al menos aproximadamente cualquiera de un 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 % o más, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunas realizaciones, la expresión de la diana permanece reducida durante al menos aproximadamente 5 días (tal como durante al menos aproximadamente cualquiera de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 días o más, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar un plásmido en una célula que comprende poner en contacto la célula con un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende el plásmido y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos X₁KWRSX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 1), en donde X₁ es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X₂-X₈ son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X₁ es βA, S o está ausente, X₂ es A o V, X₃ es G o L, X₄ es W o Y, X₅ es V o S, X₆ es R, V o A, X₇ es S o L y X₈ es W o Y. En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende la secuencia de aminoácidos de KWSAGWRWRLWVRVRSWSR (SEQ ID NO: 2), KWSALYRWRLWRSRSWSR (SEQ ID NO: 3) o KWSALYRWRLWRSALYSR (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar del plásmido al péptido de ADGN en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*.

55 En algunas realizaciones, la célula es una célula inmunitaria, tal como un granulocito, un mastocito, un monocito, una célula dendrítica, un linfocito B, un linfocito T o una célula citolítica natural. En algunas realizaciones, el linfocito T es

un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, la célula es un fibroblasto. En algunas realizaciones, el plásmido codifica un producto terapéutico o un producto útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el plásmido codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer y el CAR se dirige a un antígeno asociado con el cáncer. En algunas realizaciones, el suministro del plásmido a la célula da como resultado la expresión de un producto codificado por el plásmido. En algunas realizaciones, el producto codificado por el plásmido se expresa durante al menos aproximadamente 5 días (tal como durante al menos aproximadamente cualquiera de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 días o más, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar un plásmido y un ARN de interferencia, tal como un ARNpi, en una célula que comprende poner en contacto la célula con un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende el plásmido, el ARN de interferencia y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos X_1 KWRSX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 1), en donde X₁ es cualquier aminoácido no está ausente y en donde X₂-X₈ son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X₁ es βA, S o está ausente, X₂ es A o V, X₃ es G o L, X₄ es W o Y, X₅ es V o S, X₆ es R, V o A, X₇ es S o L y X₈ es W o Y. En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende la secuencia de aminoácidos de KWSAGWRWRLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 2), KWSALYRWRLWRSRSWSR (SEQ ID NO: 3) o KWSALYRWRLWRSALYSR (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar del plásmido al péptido de ADGN en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40) y la relación molar del ARN de interferencia al péptido de ADGN en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, la célula es una célula inmunitaria, tal como un granulocito, un mastocito, un monocito, una célula dendrítica, un linfocito B, un linfocito T o una célula citolítica natural. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, la célula es un fibroblasto. En algunas realizaciones, el plásmido codifica un producto terapéutico o un producto útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el plásmido codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer y el CAR se dirige a un antígeno asociado con el cáncer. En algunas realizaciones, el suministro del plásmido a la célula da como resultado la expresión de un producto codificado por el plásmido. En algunas realizaciones, el producto codificado por el plásmido se expresa durante al menos aproximadamente 5 días (tal como durante al menos aproximadamente cualquiera de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 días o más, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunas realizaciones, el ARN de interferencia se dirige específicamente a una molécula de ARN, tal como un ARNm, que codifica una proteína implicada en la regulación negativa de una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, el ARN de interferencia se dirige específicamente a ARNm que codifica una molécula coestimuladora negativa. En algunas realizaciones, la molécula coestimuladora negativa incluye, por ejemplo, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3 y CTLA-4. En algunas realizaciones, el ARN de interferencia es ARNpi. En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar un plásmido y un ARN de interferencia, tal como un ARNpi, en una célula que comprende poner en contacto la célula con a) un primer complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el primer complejo o nanopartícula comprende el plásmido y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos X_1 KWRSX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 1); y b) un segundo complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el segundo complejo o la nanopartícula comprende el ARN de interferencia y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos X_1 KWRSX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 1), en donde X₁ es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X₂-X₈ son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X₁ es βA, S o está ausente, X₂ es A o V, X₃ es G o L, X₄ es W o Y, X₅ es V o S, X₆ es R, V o A, X₇ es S o L y X₈ es W o Y. En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende la secuencia de aminoácidos de KWSAGWRWRLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 2), KWSALYRWRLWRSRSWSR (SEQ ID NO: 3) o KWSALYRWRLWRSALYSR (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar del plásmido al péptido de ADGN en el primer complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40) y la relación molar del ARN de interferencia al péptido de ADGN en el segundo complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En

algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el primer y el segundo complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el primer y el segundo complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el primer y el segundo complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, la célula es una célula inmunitaria, tal como un granulocito, un mastocito, un monocito, una célula dendrítica, un linfocito B, un linfocito T o una célula citolítica natural. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, la célula es un fibroblasto. En algunas realizaciones, el plásmido codifica un producto terapéutico o un producto útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el plásmido codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer y el CAR se dirige a un antígeno asociado con el cáncer. En algunas realizaciones, el suministro del plásmido a la célula da como resultado la expresión de un producto codificado por el plásmido. En algunas realizaciones, el producto codificado por el plásmido se expresa durante al menos aproximadamente 5 días (tal como durante al menos aproximadamente cualquiera de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 días o más, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunas realizaciones, el ARN de interferencia se dirige específicamente a una molécula de ARN, tal como un ARNm, que codifica una proteína implicada en la regulación negativa de una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, el ARN de interferencia se dirige específicamente a ARNm que codifica una molécula coestimuladora negativa. En algunas realizaciones, la molécula coestimuladora negativa incluye, por ejemplo, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3 y CTLA-4. En algunas realizaciones, el ARN de interferencia es ARNpi. En algunas realizaciones, el primer y/o el segundo complejo o nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga adicionales. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar un polipéptido en una célula que comprende poner en contacto la célula con un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende el polipéptido y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos $X_1\text{KWR}S\text{X}_2\text{X}_3\text{X}_4\text{RWRLWRX}_5\text{X}_6\text{X}_7\text{X}_8\text{SR}$ (SEQ ID NO: 1), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X_2 - X_8 son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X_1 es βA , S o está ausente, X_2 es A o V, X_3 es G o L, X_4 es W o Y, X_5 es V o S, X_6 es R, V o A, X_7 es S o L y X_8 es W o Y. En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende la secuencia de aminoácidos de $\text{KWR}S\text{AGWR}W\text{RLWRVRSWSR}$ (SEQ ID NO: 2), $\text{KWR}S\text{ALYRWRLWRSR}S\text{WSR}$ (SEQ ID NO: 3) o $\text{KWR}S\text{ALYRWRLWRSALY}S\text{R}$ (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar del polipéptido al péptido de ADGN en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, la célula es una célula inmunitaria, tal como un granulocito, un mastocito, un monocito, una célula dendrítica, un linfocito B, un linfocito T o una célula citolítica natural. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, la célula es un fibroblasto. En algunas realizaciones, el polipéptido es útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar una molécula pequeña en una célula que comprende poner en contacto la célula con un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende la molécula pequeña y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos $X_1\text{KWR}S\text{X}_2\text{X}_3\text{X}_4\text{RWRLWRX}_5\text{X}_6\text{X}_7\text{X}_8\text{SR}$ (SEQ ID NO: 1), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X_2 - X_8 son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X_1 es βA , S o está ausente, X_2 es A o V, X_3 es G o L, X_4 es W o Y, X_5 es V o S, X_6 es R, V o A, X_7 es S o L y X_8 es W o Y. En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende la secuencia de aminoácidos de $\text{KWR}S\text{AGWR}W\text{RLWRVRSWSR}$ (SEQ ID NO: 2), $\text{KWR}S\text{ALYRWRLWRSR}S\text{WSR}$ (SEQ ID NO: 3) o $\text{KWR}S\text{ALYRWRLWRSALY}S\text{R}$ (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar de la molécula pequeña al péptido de ADGN en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la célula con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, la célula es una célula inmunitaria, tal como un granulocito, un mastocito, un monocito, una célula dendrítica, un linfocito B, un linfocito T o una célula citolítica natural. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, la célula es un fibroblasto.

En algunas realizaciones, la molécula pequeña es útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar una molécula en un linfocito T que comprende poner en contacto la célula con un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende la molécula y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos X_1 KWRSX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 1), en donde X₁ es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X₂-X₈ son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X₁ es βA, S o está ausente, X₂ es A o V, X₃ es G o L, X₄ es W o Y, X₅ es V o S, X₆ es R, V o A, X₇ es S o L y X₈ es W o Y. En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende la secuencia de aminoácidos de KWSAGWRWRLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 2), KWSALYRWRLWRSRWSR (SEQ ID NO: 3) o KWSALYRWRLWRSALYSR (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar de la molécula al péptido de ADGN en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, la molécula es una molécula de carga como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la molécula de carga se selecciona entre el grupo que consiste en ácidos nucleicos, polipéptidos y moléculas pequeñas. En algunas realizaciones, la molécula de carga es útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar un ácido nucleico en un linfocito T que comprende poner en contacto la célula con un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o nanopartícula comprende el ácido nucleico y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos X_1 KWRSX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 1), en donde X₁ es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X₂-X₈ son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X₁ es βA, S o está ausente, X₂ es A o V, X₃ es G o L, X₄ es W o Y, X₅ es V o S, X₆ es R, V o A, X₇ es S o L y X₈ es W o Y. En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende la secuencia de aminoácidos de KWSAGWRWRLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 2), KWSALYRWRLWRSRWSR (SEQ ID NO: 3) o KWSALYRWRLWRSALYSR (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar del ácido nucleico al péptido de ADGN en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ARN, tal como ARNpi. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ADN, tal como ADN plasmídico. En algunas realizaciones, el plásmido codifica un producto terapéutico o un producto útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el plásmido codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar ARNpi en un linfocito T que comprende poner en contacto la célula con un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende el ARNpi y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos X_1 KWRSX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 1), en donde X₁ es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X₂-X₈ son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X₁ es βA, S o está ausente, X₂ es A o V, X₃ es G o L, X₄ es W o Y, X₅ es V o S, X₆ es R, V o A, X₇ es S o L y X₈ es W o Y. En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende la secuencia de aminoácidos de KWSAGWRWRLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 2), KWSALYRWRLWRSRWSR (SEQ ID NO: 3) o KWSALYRWRLWRSALYSR (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar del ARNpi al péptido de ADGN en el complejo o la nanopartícula es de

aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, el ARNpi es útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el suministro del ARNpi en la célula da como resultado la expresión reducida de una diana en la célula. En algunas realizaciones, se reduce la expresión de la diana en al menos aproximadamente un 30 % (tal como en al menos aproximadamente cualquiera de un 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 % o más, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunas realizaciones, la expresión de la diana permanece reducida durante al menos aproximadamente 5 días (tal como durante al menos aproximadamente cualquiera de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 días o más, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar un plásmido en un linfocito T que comprende poner en contacto la célula con un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende el plásmido y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos $X_1\text{KWRX}_2\text{X}_3\text{X}_4\text{RWRLWRX}_5\text{X}_6\text{X}_7\text{X}_8\text{SR}$ (SEQ ID NO: 1), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X_2 - X_8 son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X_1 es βA , S o está ausente, X_2 es A o V, X_3 es G o L, X_4 es W o Y, X_5 es V o S, X_6 es R, V o A, X_7 es S o L y X_8 es W o Y. En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende la secuencia de aminoácidos de $\text{KWRX}_2\text{SAGWRWRLWRVRSWSR}$ (SEQ ID NO: 2), $\text{KWRX}_2\text{SALYRWRLWRSRWSR}$ (SEQ ID NO: 3) o $\text{KWRX}_2\text{SALYRWRLWRSALYSR}$ (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar del plásmido al péptido de ADGN en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, el plásmido codifica un producto terapéutico o un producto útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el plásmido codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer y el CAR se dirige a un antígeno asociado con el cáncer. En algunas realizaciones, el suministro del plásmido a la célula da como resultado la expresión de un producto codificado por el plásmido. En algunas realizaciones, el producto codificado por el plásmido se expresa durante al menos aproximadamente 5 días (tal como durante al menos aproximadamente cualquiera de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 días o más, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales comprenden uno o más ARN de interferencia, tal como ARNpi, que se dirige específicamente a una molécula de ARN, tal como un ARNm, que codifica una proteína implicada en la regulación negativa de una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, el ARN de interferencia se dirige específicamente a ARNm que codifica una molécula coestimuladora negativa. En algunas realizaciones, la molécula coestimuladora negativa incluye, por ejemplo, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3 y CTLA-4.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar un plásmido y un ARN de interferencia, tal como un ARNpi, en un linfocito T que comprende poner en contacto la célula con un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende el plásmido, el ARN de interferencia y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos $X_1\text{KWRX}_2\text{X}_3\text{X}_4\text{RWRLWRX}_5\text{X}_6\text{X}_7\text{X}_8\text{SR}$ (SEQ ID NO: 1), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X_2 - X_8 son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X_1 es βA , S o está ausente, X_2 es A o V, X_3 es G o L, X_4 es W o Y, X_5 es V o S, X_6 es R, V o A, X_7 es S o L y X_8 es W o Y. En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende la secuencia de aminoácidos de $\text{KWRX}_2\text{SAGWRWRLWRVRSWSR}$ (SEQ ID NO: 2), $\text{KWRX}_2\text{SALYRWRLWRSRWSR}$ (SEQ ID NO: 3) o $\text{KWRX}_2\text{SALYRWRLWRSALYSR}$ (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar del plásmido al péptido de ADGN en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40) y la relación molar del ARN de interferencia al péptido de ADGN en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo

o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, el plásmido codifica un producto terapéutico o un producto útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el plásmido codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer y el CAR se dirige a un antígeno asociado con el cáncer. En algunas realizaciones, el suministro del plásmido a la célula da como resultado la expresión de un producto codificado por el plásmido. En algunas realizaciones, el producto codificado por el plásmido se expresa durante al menos aproximadamente 5 días (tal como durante al menos aproximadamente cualquiera de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 días o más, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunas realizaciones, el ARN de interferencia se dirige específicamente a una molécula de ARN, tal como un ARNm, que codifica una proteína implicada en la regulación negativa de una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, el ARN de interferencia se dirige específicamente a un ARNm que codifica una molécula coestimuladora negativa. En algunas realizaciones, la molécula coestimuladora negativa incluye, por ejemplo, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3 y CTLA-4. En algunas realizaciones, el ARN de interferencia es ARNpi. En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar un plásmido y un ARN de interferencia, tal como un ARNpi, en un linfocito T que comprende poner en contacto la célula con a) un primer complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el primer complejo o nanopartícula comprende el plásmido y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos $X_1\text{KWRXS}_2\text{X}_3\text{X}_4\text{RWLWRX}_5\text{X}_6\text{X}_7\text{X}_8\text{SR}$ (SEQ ID NO: 1); y b) un segundo complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el segundo complejo o la nanopartícula comprende el ARN de interferencia y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos $X_1\text{KWRXS}_2\text{X}_3\text{X}_4\text{RWLWRX}_5\text{X}_6\text{X}_7\text{X}_8\text{SR}$ (SEQ ID NO: 1), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde $X_2\text{-X}_8$ son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X_1 es βA , S o está ausente, X_2 es A o V, X_3 es G o L, X_4 es W o Y, X_5 es V o S, X_6 es R, V o A, X_7 es S o L y X_8 es W o Y. En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende la secuencia de aminoácidos de $\text{KWR SAGWRWRLWRVRSWSR}$ (SEQ ID NO: 2), $\text{KWR SLYRWRLWRSRSWSR}$ (SEQ ID NO: 3) o $\text{KWR SLYRWRLWRSALYSR}$ (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar del plásmido al péptido de ADGN en el primer complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40) y la relación molar del ARN de interferencia al péptido de ADGN en el segundo complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el primer y el segundo complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el primer y el segundo complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el primer y el segundo complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, el plásmido codifica un producto terapéutico o un producto útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el plásmido codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer y el CAR se dirige a un antígeno asociado con el cáncer. En algunas realizaciones, el suministro del plásmido a la célula da como resultado la expresión de un producto codificado por el plásmido. En algunas realizaciones, el producto codificado por el plásmido se expresa durante al menos aproximadamente 5 días (tal como durante al menos aproximadamente cualquiera de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 días o más, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunas realizaciones, el ARN de interferencia se dirige específicamente a una molécula de ARN, tal como un ARNm, que codifica una proteína implicada en la regulación negativa de una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, el ARN de interferencia se dirige específicamente a un ARNm que codifica una molécula coestimuladora negativa. En algunas realizaciones, la molécula coestimuladora negativa incluye, por ejemplo, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3 y CTLA-4. En algunas realizaciones, el ARN de interferencia es ARNpi. En algunas realizaciones, el primer y/o el segundo complejo o nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga adicionales. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar un polipéptido en un linfocito T que comprende poner en contacto la célula con un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o nanopartícula comprende el polipéptido y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos $X_1\text{KWRXS}_2\text{X}_3\text{X}_4\text{RWLWRX}_5\text{X}_6\text{X}_7\text{X}_8\text{SR}$ (SEQ ID NO: 1), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde $X_2\text{-X}_8$ son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X_1 es βA , S o está ausente, X_2 es A o V, X_3 es G o L, X_4 es W o Y, X_5 es V o S, X_6 es R, V o A, X_7 es S o L y X_8 es W o Y. En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende la secuencia de aminoácidos de $\text{KWR SAGWRWRLWRVRSWSR}$ (SEQ ID NO: 2), $\text{KWR SLYRWRLWRSRSWSR}$ (SEQ ID NO: 3) o $\text{KWR SLYRWRLWRSALYSR}$ (SEQ ID NO: 4). En algunas

- realizaciones, la relación molar del polipéptido al péptido de ADGN en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, el polipéptido es útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.
- 15 En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar una molécula pequeña en un linfocito T que comprende poner en contacto la célula con un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende la molécula pequeña y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos X₁KWRSX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 1), en donde X₁ es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X₂-X₈ son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X₁ es βA, S o está ausente, X₂ es A o V, X₃ es G o L, X₄ es W o Y, X₅ es V o S, X₆ es R, V o A, X₇ es S o L y X₈ es W o Y. En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende la secuencia de aminoácidos de KWRSAGRWRLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 2), KWRSAlyRWRLWRSWSR (SEQ ID NO: 3) o KWRSAlyRWRLWRSALYSR (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar de la molécula pequeña al péptido de ADGN en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo.
- 30 En algunas realizaciones, la molécula pequeña es útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.
- 35 En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar una molécula en un linfocito T que comprende poner en contacto la célula con un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende la molécula y un péptido VEPEP-9 que comprende la secuencia de aminoácidos X₁X₂X₃WWX₄X₅WAX₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂WX₁₃R (SEQ ID NO: 25), en donde X₁ es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X₂-X₁₃ son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X₁ es βA, S o está ausente, X₂ es L o está ausente, X₃ es R o está ausente, X₄ es L, R o G, X₅ es R, W o S, X₆ es S, P o T, X₇ es W o P, X₈ es F, A o R, X₉ es S, L, P o R, X₁₀ es R o S, X₁₁ es W o está ausente, X₁₂ es A, R o está ausente y X₁₃ es W o F y en donde si X₃ está ausente, entonces X₂, X₁₁ y X₁₂ también están ausentes. En algunas realizaciones, el péptido VEPEP-9 comprende la secuencia de aminoácidos de LRWWLRWASRWFSRWAWWR (SEQ ID NO: 26), LRWWLRWASRWASRWAWFR (SEQ ID NO: 27) o RWWLRWASRWALSWRWWR (SEQ ID NO: 28). En algunas realizaciones, la relación molar de la molécula al péptido VEPEP-9 en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, la molécula es una molécula de carga como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la molécula de carga se selecciona entre el grupo que consiste en ácidos nucleicos, polipéptidos y moléculas pequeñas. En algunas realizaciones, la molécula de carga es útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.
- 60 En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar un ácido nucleico en un linfocito T que comprende poner en contacto la célula con un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende el ácido nucleico y un péptido VEPEP-9 que comprende la secuencia de aminoácidos X₁X₂X₃WWX₄X₅WAX₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂WX₁₃R (SEQ ID NO: 25), en donde X₁ es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X₂-X₁₃ son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X₁ es βA, S o está ausente, X₂ es L o está ausente, X₃ es R o está ausente, X₄ es L, R o G, X₅ es R, W o S, X₆ es S, P o T, X₇ es W o P, X₈ es F, A o R, X₉ es S, L, P o R, X₁₀ es R o S, X₁₁ es W o está ausente, X₁₂ es A, R o está ausente y X₁₃ es W o F y en donde si X₃ está ausente, entonces X₂, X₁₁ y X₁₂ también están ausentes. En algunas realizaciones, el péptido VEPEP-9 comprende la secuencia de aminoácidos de LRWWLRWASRWFSRWAWWR (SEQ ID NO: 26), LRWWLRWASRWASRWAWFR (SEQ ID NO: 27) o RWWLRWASRWALSWRWWR (SEQ ID NO: 28). En algunas realizaciones, la relación molar de la molécula al péptido VEPEP-9 en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, la molécula es una molécula de carga como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la molécula de carga se selecciona entre el grupo que consiste en ácidos nucleicos, polipéptidos y moléculas pequeñas. En algunas realizaciones, la molécula de carga es útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.
- 65 En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar un ácido nucleico en un linfocito T que comprende poner en contacto la célula con un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende el ácido nucleico y un péptido VEPEP-9 que comprende la secuencia de aminoácidos X₁X₂X₃WWX₄X₅WAX₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂WX₁₃R (SEQ ID NO: 25), en donde X₁ es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X₂-X₁₃ son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X₁ es βA, S o está ausente, X₂ es L o está ausente, X₃ es R o está ausente, X₄ es L, R o G, X₅ es R, W o S, X₆ es S, P o T, X₇ es W o P, X₈ es F, A o R, X₉ es S, L, P o R, X₁₀ es R o S, X₁₁ es W o está ausente, X₁₂ es A, R o está ausente y X₁₃ es W o F y en donde si X₃ está ausente, entonces X₂, X₁₁ y X₁₂ también están ausentes. En algunas realizaciones, el péptido VEPEP-9 comprende la secuencia de aminoácidos de LRWWLRWASRWFSRWAWWR (SEQ ID NO: 26), LRWWLRWASRWASRWAWFR (SEQ ID NO: 27) o RWWLRWASRWALSWRWWR (SEQ ID NO: 28). En algunas realizaciones, la relación molar de la molécula al péptido VEPEP-9 en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, la molécula es una molécula de carga como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la molécula de carga se selecciona entre el grupo que consiste en ácidos nucleicos, polipéptidos y moléculas pequeñas. En algunas realizaciones, la molécula de carga es útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.

- R, X₉ es S, L, P o R, X₁₀ es R o S, X₁₁ es W o está ausente, X₁₂ es A, R o está ausente y X₁₃ es W o F y en donde si X₃ está ausente, entonces X₂, X₁₁ y X₁₂ también están ausentes. En algunas realizaciones, el péptido VEPEP-9 comprende la secuencia de aminoácidos de LRWWLRWASRWFSRWAWWR (SEQ ID NO: 26), LRWWLRWASRWASRWAWFR (SEQ ID NO: 27) o RWWLRWASRWALSWRWWR (SEQ ID NO: 28). En algunas realizaciones, la relación molar del ácido nucleico al péptido VEPEP-9 en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ARN, tal como ARNpi. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ADN, tal como ADN plasmídico. En algunas realizaciones, el plásmido codifica un producto terapéutico o un producto útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el plásmido codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.
- En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar ARNpi en un linfocito T que comprende poner en contacto la célula con un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende la ARNpi y un péptido VEPEP-9 que comprende la secuencia de aminoácidos X₁X₂X₃WWX₄X₅WAX₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂WX₁₃R (SEQ ID NO: 25), en donde X₁ es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X₂-X₁₃ son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X₁ es βA, S o está ausente, X₂ es L o está ausente, X₃ es R o está ausente, X₄ es L, R o G, X₅ es R, W o S, X₆ es S, P o T, X₇ es W o P, X₈ es F, A o R, X₉ es S, L, P o R, X₁₀ es R o S, X₁₁ es W o está ausente, X₁₂ es A, R o está ausente y X₁₃ es W o F y en donde si X₃ está ausente, entonces X₂, X₁₁ y X₁₂ también están ausentes. En algunas realizaciones, el péptido VEPEP-9 comprende la secuencia de aminoácidos de LRWWLRWASRWFSRWAWWR (SEQ ID NO: 26), LRWWLRWASRWASRWAWFR (SEQ ID NO: 27) o RWWLRWASRWALSWRWWR (SEQ ID NO: 28). En algunas realizaciones, la relación molar del ARNpi al péptido VEPEP-9 en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, el ARNpi es útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el suministro del ARNpi en la célula da como resultado la expresión reducida de una diana en la célula. En algunas realizaciones, se reduce la expresión de la diana en al menos aproximadamente un 30 % (tal como en al menos aproximadamente cualquiera de un 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 % o más, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunas realizaciones, la expresión de la diana permanece reducida durante al menos aproximadamente 5 días (tal como durante al menos aproximadamente cualquiera de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 días o más, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.
- En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar un plásmido en un linfocito T que comprende poner en contacto la célula con un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende el plásmido y un péptido VEPEP-9 que comprende la secuencia de aminoácidos X₁X₂X₃WWX₄X₅WAX₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂WX₁₃R (SEQ ID NO: 25), en donde X₁ es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X₂-X₁₃ son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X₁ es βA, S o está ausente, X₂ es L o está ausente, X₃ es R o está ausente, X₄ es L, R o G, X₅ es R, W o S, X₆ es S, P o T, X₇ es W o P, X₈ es F, A o R, X₉ es S, L, P o R, X₁₀ es R o S, X₁₁ es W o está ausente, X₁₂ es A, R o está ausente y X₁₃ es W o F y en donde si X₃ está ausente, entonces X₂, X₁₁ y X₁₂ también están ausentes. En algunas realizaciones, el péptido VEPEP-9 comprende la secuencia de aminoácidos de LRWWLRWASRWFSRWAWWR (SEQ ID NO: 26), LRWWLRWASRWASRWAWFR (SEQ ID NO: 27) o RWWLRWASRWALSWRWWR (SEQ ID NO: 28). En algunas realizaciones, la relación molar del plásmido al péptido VEPEP-9 en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto

del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, el plásmido codifica un producto terapéutico o un producto útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el plásmido codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer y el CAR se dirige a un antígeno asociado con el cáncer.

En algunas realizaciones, el suministro del plásmido a la célula da como resultado la expresión de un producto codificado por el plásmido. En algunas realizaciones, el producto codificado por el plásmido se expresa durante al menos aproximadamente 5 días (tal como durante al menos aproximadamente cualquiera de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 días o más, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar un plásmido y un ARN de interferencia, tal como un ARNpi, en un linfocito T que comprende poner en contacto la célula con un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende el plásmido, el ARN de interferencia y un péptido VEPEP-9 que comprende la secuencia de aminoácidos $X_1X_2X_3WWX_4X_5WAX_6X_3X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}WX_{13}R$ (SEQ ID NO: 25), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X_2 - X_{13} son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X_1 es βA , S o está ausente, X_2 es L o está ausente, X_3 es R o está ausente, X_4 es L, R o G, X_5 es R, W o S, X_6 es S, P o T, X_7 es W o P, X_8 es F, A o R, X_9 es S, L, P o R, X_{10} es R o S, X_{11} es W o está ausente, X_{12} es A, R o está ausente y X_{13} es W o F y en donde si X_3 está ausente, entonces X_2 , X_{11} y X_{12} también están ausentes.

En algunas realizaciones, el péptido VEPEP-9 comprende la secuencia de aminoácidos de LRWWLRWASRWFSRWAWWR (SEQ ID NO: 26), LRWWLRWASRWASRWAWFR (SEQ ID NO: 27) o RWWLRWASRWALSWRWWR (SEQ ID NO: 28). En algunas realizaciones, la relación molar del plásmido al péptido VEPEP-9 en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40) y la relación molar del ARN de interferencia al péptido VEPEP-9 en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, el plásmido codifica un producto terapéutico o un producto útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas).

En algunas realizaciones, el plásmido codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer y el CAR se dirige a un antígeno asociado con el cáncer. En algunas realizaciones, el suministro del plásmido a la célula da como resultado la expresión de un producto codificado por el plásmido. En algunas realizaciones, el producto codificado por el plásmido se expresa durante al menos aproximadamente 5 días (tal como durante al menos aproximadamente cualquiera de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 días o más, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunas realizaciones, el ARN de interferencia se dirige específicamente a una molécula de ARN, tal como un ARNm, que codifica una proteína implicada en la regulación negativa de una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, el ARN de interferencia se dirige específicamente a ARNm que codifica una molécula coestimuladora negativa. En algunas realizaciones, la molécula coestimuladora negativa incluye, por ejemplo, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3 y CTLA-4. En algunas realizaciones, el ARN de interferencia es ARNpi. En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar un plásmido y un ARN de interferencia, tal como un ARNpi, en un linfocito T que comprende poner en contacto la célula con a) un primer complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el primer complejo o nanopartícula comprende el plásmido y un péptido VEPEP-9 que comprende la secuencia de aminoácidos $X_1X_2X_3WWX_4X_5WAX_6X_3X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}WX_{13}R$ (SEQ ID NO: 25); y b) un segundo complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el segundo complejo o la nanopartícula comprende el ARN de interferencia y un péptido VEPEP-9 que comprende la secuencia de aminoácidos $X_1X_2X_3WWX_4X_5WAX_6X_3X_7X_8X_9WX_{13}R$ (SEQ ID NO: 25), en donde X_1 es cualquier aminoácido o ninguno y en donde X_2 - X_{13} son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X_1 es βA , S o está ausente, X_2 es L o está ausente, X_3 es R o está ausente, X_4 es L, R o G, X_5 es R, W o S, X_6 es S, P o T, X_7 es W o P, X_8 es F, A o R, X_9 es S, L, P o R, X_{10} es R o S, X_{11} es W o está ausente, X_{12} es A, R o está ausente y X_{13} es W o F y en donde si X_3 está ausente, entonces X_2 , X_{11} y X_{12} también están ausentes. En algunas realizaciones, el péptido VEPEP-9 comprende la secuencia de aminoácidos de LRWWLRWASRWFSRWAWWR (SEQ ID NO: 26), LRWWLRWASRWASRWAWFR (SEQ ID NO: 27) o RWWLRWASRWALSWRWWR (SEQ ID NO: 28). En algunas realizaciones, la relación molar del

plásmido al péptido VEPEP-9 en el primer complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40) y la relación molar del ARN de interferencia al péptido VEPEP-9 en el segundo complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la
5 puesta en contacto del linfocito T con el primer y el segundo complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el primer y el segundo complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el primer y el segundo complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal
10 como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, el plásmido codifica un producto terapéutico o un producto útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el plásmido codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer y el CAR se dirige a un antígeno asociado con el cáncer. En algunas realizaciones, el suministro del plásmido a la célula da como resultado la expresión de un producto codificado por el plásmido. En algunas
15 realizaciones, el producto codificado por el plásmido se expresa durante al menos aproximadamente 5 días (tal como durante al menos aproximadamente cualquiera de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 días o más, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunas realizaciones, el ARN de interferencia se dirige específicamente a una molécula de ARN, tal como un ARNm, que codifica una proteína implicada en la regulación negativa de una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, el ARN de interferencia se dirige específicamente a un ARNm que codifica una molécula coestimuladora negativa. En algunas realizaciones, la molécula coestimuladora negativa incluye, por ejemplo, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3 y CTLA-4. En algunas realizaciones, el ARN de interferencia es ARNpi. En algunas realizaciones, el primer y/o el segundo complejo o nanopartícula comprende
20 además una o más moléculas de carga adicionales. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar un polipéptido en un linfocito T que comprende poner en contacto la célula con un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo
30 o la nanopartícula comprende el polipéptido y un péptido VEPEP-9 que comprende la secuencia de aminoácidos $X_1X_2X_3WWX_4X_5WAX_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}WX_{13}R$ (SEQ ID NO: 25), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X_2 - X_{13} son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X_1 es βA , S o está ausente, X_2 es L o está ausente, X_3 es R o está ausente, X_4 es L, R o G, X_5 es R, W o S, X_6 es S, P o T, X_7 es W o P, X_8 es F, A o R, X_9 es S, L, P o R, X_{10} es R o S, X_{11} es W o está ausente, X_{12} es A, R o está ausente y X_{13} es W o F y en donde si X_3 está ausente, entonces X_2 , X_{11} y X_{12} también están ausentes. En algunas realizaciones, el péptido VEPEP-9 comprende la secuencia de aminoácidos de LRWWLRWASRWFSRWAWWR (SEQ ID NO: 26), LRWWLRWASRWASRWAWFR (SEQ ID NO: 27) o RWWLRWASRWALSRRWWR (SEQ ID NO: 28). En algunas realizaciones, la relación molar del polipéptido al péptido VEPEP-9 en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente
40 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, el polipéptido es
45 útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para administrar una molécula pequeña en un linfocito T que comprende poner en contacto la célula con un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende la molécula pequeña y un péptido VEPEP-9 que comprende la secuencia de aminoácidos $X_1X_2X_3WWX_4X_5WAX_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}WX_{13}R$ (SEQ ID NO: 25), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X_2 - X_{13} son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X_1 es βA , S o está ausente, X_2 es L o está ausente, X_3 es R o está ausente, X_4 es L, R o G, X_5 es R, W o S, X_6 es S, P o T, X_7 es W o P, X_8 es F, A o R, X_9 es S, L, P o R, X_{10} es R o S, X_{11} es W o está ausente, X_{12} es A, R o está ausente y X_{13} es W o F y en donde si X_3 está ausente, entonces X_2 , X_{11} y X_{12} también están ausentes. En algunas realizaciones, el péptido VEPEP-9 comprende la secuencia de aminoácidos de LRWWLRWASRWFSRWAWWR (SEQ ID NO: 26), LRWWLRWASRWASRWAWFR (SEQ ID NO: 27) o RWWLRWASRWALSRRWWR (SEQ ID NO: 28). En algunas realizaciones, la relación molar de la molécula pequeña al péptido VEPEP-9 en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *in vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo*. En algunas realizaciones, la puesta en contacto del linfocito T con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo
60 *in vitro*. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inmortalizado, tal como un linfocito T de una línea de

linfocitos T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T primario, tal como un linfocito T de un individuo. En algunas realizaciones, la molécula pequeña es útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para suministrar una molécula a una célula en un individuo que comprende administrar al individuo una composición que comprende un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende la molécula y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos X_1 KWRSX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 1), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X_2 - X_8 son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X_1 es β A, S o está ausente, X_2 es A o V, X_3 es G o L, X_4 es W o Y, X_5 es V o S, X_6 es R, V o A, X_7 es S o L y X_8 es W o Y. En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende la secuencia de aminoácidos de KWSAGWRWRLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 2), KWSALYRWRLWRSRWSR (SEQ ID NO: 3) o KWSALYRWRLWRSALYSR (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar de la molécula al péptido de ADGN en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la composición se administra al individuo por una vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intravesicular, subcutánea, intratecal, intrapulmonar, intramuscular, intratraqueal, intraocular, transdérmica, oral o por inhalación. En algunas realizaciones, la composición se administra al individuo por una vía intravenosa. En algunas realizaciones, la composición se administra al individuo por una vía subcutánea. En algunas realizaciones, la molécula es una molécula de carga como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la molécula de carga se selecciona entre el grupo que consiste en ácidos nucleicos, polipéptidos y moléculas pequeñas. En algunas realizaciones, la célula es una célula inmunitaria, tal como un granulocito, un mastocito, un monocito, una célula dendrítica, un linfocito B, un linfocito T o una célula citolítica natural. En algunas realizaciones, el individuo tiene o se encuentra en riesgo de desarrollar, una enfermedad y la molécula de carga es útil para el tratamiento de la enfermedad. En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad. En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica y comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el individuo es un mamífero. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para suministrar un ácido nucleico a una célula en un individuo que comprende administrar al individuo una composición que comprende un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende el ácido nucleico y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos X_1 KWRSX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 1), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X_2 - X_8 son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X_1 es β A, S o está ausente, X_2 es A o V, X_3 es G o L, X_4 es W o Y, X_5 es V o S, X_6 es R, V o A, X_7 es S o L y X_8 es W o Y. En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende la secuencia de aminoácidos de KWSAGWRWRLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 2), KWSALYRWRLWRSRWSR (SEQ ID NO: 3) o KWSALYRWRLWRSALYSR (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar del ácido nucleico al péptido de ADGN en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la composición se administra al individuo por una vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intravesicular, subcutánea, intratecal, intrapulmonar, intramuscular, intratraqueal, intraocular, transdérmica, oral o por inhalación. En algunas realizaciones, la composición se administra al individuo por una vía intravenosa. En algunas realizaciones, la composición se administra al individuo por una vía subcutánea. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ARN, tal como ARNpi. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ADN, tal como ADN plasmídico. En algunas realizaciones, el plásmido codifica un producto terapéutico o un producto útil para el tratamiento de una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades que se van a tratar descritas en el presente documento (por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas). En algunas realizaciones, el plásmido codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas realizaciones, la célula es una célula inmunitaria, tal como un granulocito, un mastocito, un monocito, una célula dendrítica, un linfocito B, un linfocito T o una célula citolítica natural. En algunas realizaciones, el individuo tiene o se encuentra en riesgo de desarrollar, una enfermedad y el ácido nucleico es útil para el tratamiento de la enfermedad. En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad. En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica y comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el individuo es un mamífero. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para suministrar un ARNpi a una célula en un individuo que comprende administrar al individuo una composición que comprende un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende el ARNpi y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos X_1 KWRSX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 1), en donde X_1 es cualquier

- aminoácido o está ausente y en donde X₂-X₈ son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X₁ es βA, S o está ausente, X₂ es A o V, X₃ es G o L, X₄ es W o Y, X₅ es V o S, X₆ es R, V o A, X₇ es S o L y X₈ es W o Y. En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende la secuencia de aminoácidos de KWRWAGWRLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 2), KWRWALYRWRLWRSRSWSR (SEQ ID NO: 3) o KWRWALYRWRLWRSALYSR (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar del ARNpi al péptido de ADGN en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la composición se administra al individuo por una vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intravascular, subcutánea, intratecal, intrapulmonar, intramuscular, intratraqueal, intraocular, transdérmica, oral o por inhalación. En algunas realizaciones, la composición se administra al individuo por una vía intravenosa. En algunas realizaciones, la composición se administra al individuo por una vía subcutánea. En algunas realizaciones, la célula es una célula inmunitaria, tal como un granulocito, un mastocito, un monocito, una célula dendrítica, un linfocito B, un linfocito T o una célula citolítica natural. En algunas realizaciones, el individuo tiene o se encuentra en riesgo de desarrollar, una enfermedad y el ARNpi es útil para el tratamiento de la enfermedad. En algunas realizaciones, el suministro del ARNpi en la célula da como resultado la expresión reducida de una diana en la célula. En algunas realizaciones, se reduce la expresión de la diana en al menos aproximadamente un 30 % (tal como en al menos aproximadamente cualquiera de un 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 % o más, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunas realizaciones, la expresión de la diana permanece reducida durante al menos aproximadamente 5 días (tal como durante al menos aproximadamente cualquiera de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 días o más, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad. En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica y comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el individuo es un mamífero. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano.
- En algunas realizaciones, se proporciona un método para suministrar un plásmido a una célula en un individuo que comprende administrar al individuo una composición que comprende un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende el plásmido y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos X₁KWRWX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 1), en donde X₁ es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X₂-X₈ son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X₁ es βA, S o está ausente, X₂ es A o V, X₃ es G o L, X₄ es W o Y, X₅ es V o S, X₆ es R, V o A, X₇ es S o L y X₈ es W o Y. En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende la secuencia de aminoácidos de KWRWAGWRLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 2), KWRWALYRWRLWRSRSWSR (SEQ ID NO: 3) o KWRWALYRWRLWRSALYSR (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar del plásmido al péptido de ADGN en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la composición se administra al individuo por una vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intravascular, subcutánea, intratecal, intrapulmonar, intramuscular, intratraqueal, intraocular, transdérmica, oral o por inhalación. En algunas realizaciones, la composición se administra al individuo por una vía intravenosa. En algunas realizaciones, la composición se administra al individuo por una vía subcutánea. En algunas realizaciones, la célula es una célula inmunitaria, tal como un granulocito, un mastocito, un monocito, una célula dendrítica, un linfocito B, un linfocito T o una célula citolítica natural. En algunas realizaciones, el individuo tiene o se encuentra en riesgo de desarrollar, una enfermedad y el plásmido codifica un producto útil para el tratamiento de la enfermedad. En algunas realizaciones, el plásmido codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas realizaciones, el CAR se dirige a un antígeno asociado con la enfermedad. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer y el CAR se dirige a un antígeno asociado con el cáncer. En algunas realizaciones, el suministro del plásmido a la célula da como resultado la expresión de un producto codificado por el plásmido. En algunas realizaciones, el producto codificado por el plásmido se expresa durante al menos aproximadamente 5 días (tal como durante al menos aproximadamente cualquiera de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 días o más, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores). En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad. En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica y comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el individuo es un mamífero. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano.
- En algunas realizaciones, se proporciona un método para suministrar un polipéptido a una célula en un individuo que comprende administrar al individuo una composición que comprende un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende el polipéptido y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos X₁KWRWX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR (SEQ ID NO: 1), en donde X₁ es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X₂-X₈ son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X₁ es βA, S o está ausente, X₂ es A o V, X₃ es G o L, X₄ es W o Y, X₅ es V o S, X₆ es R, V o A, X₇ es S o L y X₈ es W o Y. En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende la secuencia de aminoácidos de KWRWAGWRLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 2), KWRWALYRWRLWRSRSWSR (SEQ ID NO: 3) o KWRWALYRWRLWRSALYSR (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar del polipéptido al péptido de ADGN en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la composición se administra al individuo por una vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intravascular, subcutánea, intratecal, intrapulmonar, intramuscular, intratraqueal, intraocular, transdérmica, oral o por inhalación. En algunas realizaciones, la composición

se administra al individuo por una vía intravenosa. En algunas realizaciones, la composición se administra al individuo por una vía subcutánea. En algunas realizaciones, la célula es una célula inmunitaria, tal como un granulocito, un mastocito, un monocito, una célula dendrítica, un linfocito B, un linfocito T o una célula citolítica natural. En algunas realizaciones, el individuo tiene o se encuentra en riesgo de desarrollar, una enfermedad y el polipéptido es útil para el tratamiento de la enfermedad. En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad. En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica y comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el individuo es un mamífero. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para suministrar una molécula pequeña a una célula en un individuo que comprende administrar al individuo una composición que comprende un complejo o nanopartícula como se ha descrito anteriormente, en donde el complejo o la nanopartícula comprende la molécula pequeña y un péptido de ADGN que comprende la secuencia de aminoácidos X_1 KWRS X_2 X_3 X_4 RWRLWR X_5 X_6 X_7 X_8 SR (SEQ ID NO: 1), en donde X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X_2 - X_8 son cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, X_1 es β A, S o está ausente, X_2 es A o V, X_3 es G o L, X_4 es W o Y, X_5 es V o S, X_6 es R, V o A, X_7 es S o L y X_8 es W o Y. En algunas realizaciones, el péptido de ADGN comprende la secuencia de aminoácidos de KWSAGWRWRLWRVRSWSR (SEQ ID NO: 2), KWSALYRWRLWRSRSWSR (SEQ ID NO: 3) o KWSALYRWRLWRSALYSR (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, la relación molar de la molécula pequeña al péptido de ADGN en el complejo o la nanopartícula es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 (tal como aproximadamente 1:20 o aproximadamente 1:40). En algunas realizaciones, la composición se administra al individuo por una vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intravascular, subcutánea, intratecal, intrapulmonar, intramuscular, intratraqueal, intraocular, transdérmica, oral o por inhalación. En algunas realizaciones, la composición se administra al individuo por una vía intravenosa. En algunas realizaciones, la composición se administra al individuo por una vía subcutánea. En algunas realizaciones, la célula es una célula inmunitaria, tal como un granulocito, un mastocito, un monocito, una célula dendrítica, un linfocito B, un linfocito T o una célula citolítica natural. En algunas realizaciones, el individuo tiene o se encuentra en riesgo de desarrollar, una enfermedad y la molécula pequeña es útil para el tratamiento de la enfermedad. En algunas realizaciones, el complejo o la nanopartícula comprende además una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, las una o más moléculas de carga adicionales son útiles para el tratamiento de la enfermedad. En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica y comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el individuo es un mamífero. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano.

En otro aspecto de la presente solicitud, se proporciona un método para estabilizar moléculas de carga (tales como un ácido nucleico), que comprende combinar las moléculas de carga con un péptido de ADGN como se ha descrito anteriormente, estabilizando de este modo las moléculas de carga. En algunas realizaciones, la molécula de carga y el péptido de ADGN forman un complejo o nanopartícula, como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la molécula de carga es un ácido nucleico y el péptido de ADGN estabiliza la estructura de hélice superenrollada del ácido nucleico. En algunas realizaciones, la molécula de carga es susceptible a la degradación (por ejemplo, por componentes del suero o nucleasas *in vitro* o *in vivo*) y el péptido de ADGN protege a la molécula de carga frente a la degradación.

Ha de entenderse que puede combinarse cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, pueden administrarse un ácido nucleico y un polipéptido a una célula combinando cualquiera de los métodos descritos anteriormente para administrar un ácido nucleico a una célula con cualquiera de los métodos descritos anteriormente para administrar un polipéptido a una célula. Las posibles combinaciones contempladas incluyen combinaciones de dos o más de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

Kits

En el presente documento también se proporcionan kits, reactivos y artículos de fabricación útiles para los métodos descritos en el presente documento. Dichos kits pueden contener viales que contienen los péptidos de ADGN, moléculas de ensamblaje y/u otros péptidos penetrantes en células, por separado de viales que contienen las moléculas de carga. En el momento del tratamiento del paciente, en primer lugar se determina qué patología concreta se va a tratar basándose en, por ejemplo, el análisis de la expresión génica o el análisis proteómico o histológico de muestras del paciente. Habiéndose obtenido estos resultados, los péptidos de ADGN y las moléculas de ensamblaje y/o péptidos penetrantes en células opcionales se combinan consecuentemente con las moléculas de carga adecuadas para dar como resultado complejos o nanopartículas que pueden administrarse al paciente para un tratamiento eficaz. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se proporciona un kit que comprende: 1) un péptido de ADGN y opcionalmente 2) una o más moléculas de carga (tal como ácidos nucleicos, por ejemplo, oligonucleótidos). En algunas realizaciones, el kit comprende además moléculas de ensamblaje y/u otros péptidos penetrantes en células. En algunas realizaciones, el kit comprende además agentes para determinar perfiles de expresión génica. En algunas realizaciones, el kit comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los kits descritos en el presente documento pueden comprender además instrucciones para usar los componentes del kit para poner en práctica los presentes métodos (por ejemplo, instrucciones para producir las composiciones

farmacéuticas descritas en el presente documento y/o para usar las composiciones farmacéuticas). Las instrucciones para poner en práctica los presentes métodos se graban generalmente en un medio de grabación adecuado. Por ejemplo, las instrucciones pueden imprimirse sobre un sustrato, tal como papel o plástico, etc. Como tales, las instrucciones pueden estar presentes en los kits en forma de prospecto, en la etiqueta del envase de los kits o los componentes del mismo (es decir, asociado con el envase o envase secundario), etc. En algunas realizaciones, las instrucciones están presentes en forma de un archivo de datos almacenado electrónicamente presente en un medio de almacenamiento legible por ordenador adecuado, por ejemplo, CD-ROM, disquete, etc. En otras realizaciones más, las instrucciones reales no están presentes en el kit, pero se proporcionan medios para obtener las instrucciones de una fuente remota, por ejemplo, a través de Internet. Un ejemplo de esta realización es un kit que incluye una página web donde pueden verse las instrucciones y/o a través de la cual pueden descargarse las instrucciones. Al igual que con las instrucciones, estos medios para obtener las instrucciones se graban en un sustrato adecuado.

Los diversos componentes del kit pueden encontrarse en envases separados, donde los envases pueden estar contenidos en un solo alojamiento, por ejemplo, una caja.

Ejemplos

Ejemplo 1: Materiales y métodos

20 Péptidos de ADGN

Todos los péptidos se sintetizaron mediante síntesis peptídica en fase sólida usando química de Fmoc. Los péptidos contenían una beta-alanina, serina o un grupo acetilo en el extremo N-terminal para permitir la funcionalización adicional sin usar el grupo cisteamida C-terminal. Los péptidos contenían un grupo cisteamida o COOH en el extremo C-terminal.

Estructura de la invención

Los péptidos de ADGN son péptidos anfipáticos secundarios; son altamente versátiles y muestran un fuerte polimorfismo estructural. Los péptidos de ADGN se encuentran desplegados en solución en forma libre y adoptan una conformación parcialmente alfa-helicoidal en presencia de la carga.

Oligonucleótidos y ARNpi

35 Se sintetizaron ARNpi de acuerdo con las siguientes secuencias:

GAPDH sentido	5'-CAUCAUCCCUGCCUCUACUTT-3' (SEQ ID No: 29)
GAPDH antisentido	5'-AGUAGAGGCAGGGAUGAUGTT-3' (SEQ ID No: 30)
Cyc-B1 sentido	5'-GGCGAAGAUAACAUGGCATT-3' (SEQ ID No: 31)
Cyc-B1 antisentido	5'-UGCCAUGUUGAUCUUCGCCTT-3' (SEQ ID No: 32)
Cyc-B3 sentido	5'-GGUGAAGAUCAUGGCATT-3' (SEQ ID No: 33)
Cyc-B3 antisentido	5'-UGCCAUGUCGAUCUUCACCTT-3' (SEQ ID No: 34)
Cdc20 sentido	5'-UGCCAUGUCGAUCUUCACCTT-3' (SEQ ID No: 35)
Cdc20 antisentido	5'-UGCCAUGUCGAUCUUCACCTT-3' (SEQ ID No: 36)
siF7 sentido	5'-GCAAAGGCGUGCCAACUCATT-3' SEQ ID No: 37)
siF7 antisentido:	5'-TGAGUUGGCACGCCUUUGCTT-3' (SEQ ID No: 38)

ADN plasmídicos

40 Se obtuvieron plásmidos que codificaban luciferasa y que tenían tamaños de 6,2 Kb y 3,8 Kb de New England BioLabs y se volvieron a clonar. Se obtuvo un plásmido que codifica YFP (6,3 Kb) de Sigma (EE. UU.) y se volvió a clonar. Se preparó como se ha descrito anteriormente un plásmido que codifica un receptor de antígeno quimérico específico para CD19 bajo el control del promotor de CMV, que comprende un scFv específico para CD19 unido a restos de señalización de CD28 y CD3z.

45 Preparación de partículas y complejos de ADGN/carga

Las nanopartículas de péptido/ARNpi o péptido/plásmido se prepararon mezclando péptido anfipático y plásmido o ARNpi. Se prepararon soluciones madre de péptido anfipático a 1 mg/ml en agua destilada y se sometieron a ultrasonidos durante 10 min. Se prepararon soluciones madre de ARNpi a una concentración de 5 µM en agua. Se prepararon soluciones madre de plásmido a una concentración de 100 µM en tampón de Tris 50 mM, EDTA 0,5 mM. Se formaron complejos o nanopartículas de péptido/plásmido en agua pura incubando péptido (solución madre 400 µM) con plásmido (solución madre 100 µM) durante 30 min a 37 °C con una relación molar final de péptido a

plásmido de 5:1, 10:1 o 20:1. Se formaron complejos o nanopartículas de péptido/ARNpi en agua o medio acuoso adecuado incubando péptido (solución madre 400 μ M) con ARNpi (solución madre 5 μ M) durante 30 min a 37 °C con una relación molar final de péptido a ARNpi de 10:1, 20:1 o 40:1. Se obtuvieron concentraciones menores de ADGN-100/ARNpi (de 20 nM a 0,125 nM) mediante dilución seriada de los complejos madre en PBS para conservar la misma relación de péptido/ARNpi. Se almacenaron el ARNpi o el plásmido solo y el complejo de péptido/plásmido en PBS durante 5 días a 20 °C y 40 °C para evaluar la estabilidad del plásmido.

En lo referente al almacenamiento y la estabilidad, las soluciones madre de partículas preparadas en agua permanecieron estables durante al menos tres semanas a 4 °C. Las partículas pueden almacenarse para su almacenamiento a largo plazo; en ese caso, se añade glucosa o manitol del 5 al 20 % a la solución de partículas antes de la liofilización para estabilizar las partículas durante el proceso.

Caracterización de nanopartículas a base de péptidos

Se determinó la distribución del tamaño medio de partículas a 25 °C durante 3 min por medición y se midió el potencial zeta con un aparato Zetasizer 4 (Malvern Ltd.). Se hizo un seguimiento del tamaño y la polidispersidad de los complejos de ADGN-100/ARNpi en condiciones fisiológicas (NaCl al 0,9 %) después de 12/24/48 horas de incubación a 4 °C, 20 °C y 40 °C. Se analizaron tres relaciones molares de péptido/ARNpi diferentes (10:1, 20:1 y 40:1).

Cultivo celular y suministro de la carga mediado por péptido

Se cultivaron células HeLa adherentes (de la Colección Americana de Cultivos Tipo [ATCC]) en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con glutamina 2 mM, antibióticos al 1 % (10.000 μ g/ml de estreptomicina, penicilina, 10.000 UI/ml) y suero fetal de ternero al 10 % (p/v) (FCS), a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía un 5 % de CO₂. Se cultivó un total de 150.000 células sembradas en una placa de 35 mm el día antes de la transfección hasta un 60 % de confluencia y se recubrieron con 200 μ l de complejos preformados, se incubaron durante 3-5 min, y después se añadieron 400 μ l de DMEM. Después de 30 min de incubación a 37 °C, se añadió 1 ml de DMEM fresco que contenía FCS al 16 % hasta alcanzar una concentración final de FCS del 10 %, si retirar la capa superior de complejos de ADGN-100/carga. Se devolvieron las células a la incubadora durante 24 o 48 horas. Para el ARNpi que se dirige a GAPDH, se determinó el nivel de ARNm 24 horas después de la transducción usando Quantigen (Panomics Inc.). Los datos comunicados son una media de 3 o 4 experimentos distintos. Para los plásmidos que codifican luciferasa, se cuantificó el nivel de expresión de luciferasa mediante luminometría después de 48 horas.

Citotoxicidad

Se investigó la toxicidad de los complejos de péptido/ARNpi en líneas celulares HeLa y Jurkat. Se incubó un total de 30.000 células sembradas en placas de 24 pocillos el día antes de la transfección con concentraciones crecientes de péptido o de complejos de péptido/ARNpi a una relación molar de 20:1 o 40:1, en el intervalo de 1 a 50 μ M (ADGN-100 500 μ M) durante 30 min antes de la adición de medio para alcanzar una concentración final de FCS del 10 %. La respuesta citotóxica se midió 12 o 24 horas después monitorizando los niveles de ARNm del gen constitutivo, ciclofilina (Quantigen, Panomic Inc.) y el ensayo colorimétrico MTT (Sigma, Alemania). Para el ensayo MTT, se retiró el medio de cultivo celular y se reemplazó con PBS que contenía 2,5 mg/ml de MTT durante 4 horas. Los resultados corresponden a la media de 3 experimentos separados.

Modelos de tumor de ratón

Se inocularon 1 x 10⁶ células HT-29 en 100 μ l de PBS por vía subcutánea en ratones desnudos atímicos hembra (6-8 semanas de edad).

Para el tratamiento con ARNpi: De dos a tres semanas después del implante de tumor, cuando el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 100 mm³, se trató a los animales mediante inyección intratumoral o intravenosa, cada 3 días, con una solución de 0,1 ml de ARNpi para Cyc-B1 libre o ARNpi para Cdc20 (50 o 100 μ g), ARNpi de control, ARNpi para Cyc-B3 y para Cyc-B1 (1, 5, 10 μ g), ARNpi para Cdc20 (5 μ g) o un cóctel de ARNpi para Cyc-B1 y Cdc20 (5 μ g cada uno) en complejo con el péptido de ADGN a una relación molar de 20:1.

Ejemplo 2: Aplicaciones del péptido de ADGN para el suministro de moléculas de ARN

Ejemplo 2.1: Los péptidos de ADGN forman nanoestructuras estables con las cargas

Se hizo un seguimiento del tamaño y la polidispersidad de los complejos péptidos/ARNpi en condiciones fisiológicas (NaCl al 0,9 %) después de 12, 24 y 48 horas de incubación a 4 °C, 20 °C y 40 °C. Se analizaron tres relaciones molares de péptido/ARNpi diferentes: 10:1, 20:1 y 40:1.

A relaciones molares de 20:1 o 40:1, los péptidos de ADGN formaron partículas estables con el ARNpi que tenían un diámetro medio de 120 nm y un índice de polidispersidad (PI) de 0,3. Las partículas mantuvieron su distribución de

tamaños (diámetro medio < 130 nm e índice de polidispersidad < 0,31) y permanecieron estables con el paso del tiempo a diferentes temperaturas (véanse las tablas 2-4). A la relación molar de 10:1, el tamaño de partícula aumentó con el paso del tiempo.

- 5 Las mediciones de la carga de la partícula de ADGN-100/ARNpi mediante el potencial zeta fueron similares para las relaciones molares de 20:1 y 40:1, con valores medios de $6,0 \pm 0,8$ mV y $5,1 \pm 1,0$ mV, respectivamente. El potencial zeta medio de las partículas con una relación molar de 10:1 fue de $15,4 \pm 0,6$ mV.

Tabla 2: Incubación de partículas de péptido/ARNpi a 20 °C

	Incubación a 20 °C 24h					
	12h				48h	
	Tamaño (nm)	PI	Tamaño (nm)	PI	Tamaño (nm)	PI
solo péptido						
péptido/ARNpi (10:1)	135 ± 5	0,43 ± 0,1	276 ± 7	0,41 ± 0,1	369 ± 20	0,54 ± 0,1
péptido/ARNpi (20:1)	126 ± 6	0,27 ± 0,1	122 ± 3	0,25 ± 0,1	131 ± 3	0,27 ± 0,1
péptido/ARNpi (40:1)	116 ± 3	0,25 ± 0,1	123 ± 5	0,31 ± 0,1	117 ± 8	0,31 ± 0,1

10

Tabla 3: Incubación de partículas de péptido/ARNpi a 4 °C

	Incubación a 4 °C					
	12h		24h		48h	
	Tamaño (nm)	PI	Tamaño (nm)	PI	Tamaño (nm)	PI
solo péptido						
péptido/ARNpi (10:1)	130 ± 5	0,5 ± 0,1	340 ± 6	0,5 ± 0,1	500 ± 12	0,6 ± 0,3
péptido/ARNpi (20:1)	132 ± 4	0,3 ± 0,1	150 ± 5	0,3 ± 0,1	190 ± 10	0,8 ± 0,3
péptido/ARNpi (40:1)	140 ± 5	0,3 ± 0,1	123 ± 5	0,4 ± 0,1	180 ± 12	0,6 ± 0,2

Tabla 4: Incubación de partículas de péptido/ARNpi a 40 °C

	Incubación a 40 °C					
	12h		24h		48h	
	Tamaño (nm)	PI	Tamaño (nm)	PI	Tamaño (nm)	PI
solo péptido						
péptido/ARNpi (10:1)	130 ± 5	0,4 ± 0,1	190 ± 4	0,4 ± 0,1	250 ± 10	0,4 ± 0,1
péptido/ARNpi (20:1)	120 ± 6	0,3 ± 0,1	140 ± 3	0,5 ± 0,1	145 ± 3	0,3 ± 0,1
péptido/ARNpi (40:1)	120 ± 3	0,3 ± 0,1	112 ± 5	0,3 ± 0,1	130 ± 8	0,3 ± 0,1

5 Ejemplo 2.2: Suministro de ARNpi mediado por péptido

Se evaluó el suministro de ARNpi por el complejo de péptido de ADGN/ARNpi en células tanto HeLa como Jurkat usando un ARNpi que se dirige a GAPDH (SEQ ID NO: 30). La transfección con ARNpi de ambas líneas celulares se llevó a cabo en placas de 6 pocillos. Se retiró el medio completo y las células se lavaron con PBS. Se diluyó una solución de partículas con una concentración de 4X en PBS 1X y se añadió inmediatamente a las células. Después de 10 min de incubación a 37 °C, se recubrieron las células con medio DMEM libre y se incubaron durante 30 - 60 min adicionales a 37 °C. Después, se añadió medio DMEM completo y se incubaron las células durante 48 horas a 37 °C, seguido de análisis por transferencia de Western.

15 Las partículas de péptido/ARNpi se analizaron a relaciones molares de 10:1, 20:1 y 40:1. Los análisis de respuesta a la dosis de ARNpi se llevaron a cabo usando diluciones seriadas de soluciones madre en PBS, con concentraciones finales de ARNpi en el intervalo de 200 nM a 10 nM. Los experimentos se realizaron por duplicado.

20 Los experimentos de respuesta a la dosis efectuados en diferentes células cultivadas revelaron que el suministro mediado por péptido de ARNpi para GAPDH indujo una robusta regulación negativa de los niveles de ARNm de GAPDH (FIG. 1A y 1B). Se obtuvo un notable silenciamiento de GAPDH en ambas líneas celulares con los complejos con relaciones molares de 20:1 y 40:1. Se observó una eficacia mayor del 60 % a concentraciones de ARNpi de 50 nM.

25 Ejemplo 2.3: Los péptidos de ADGN forman nanoestructuras estables con el ARNss corto

Se evaluaron dos ARNss: G1 (9-Mero: 3'-AGC AGC AGC-5', SEQ ID NO: 39) y G2 (12-mero: 3'-AGC AGC AGC AGC-5', SEQ ID NO: 40). Se hizo un seguimiento del tamaño y la polidispersidad de los complejos de péptido/G1 y péptido/G2 en condiciones fisiológicas (NaCl al 0,9 %) después de 12 y 24 horas de incubación a 4 °C y 20 °C. Se analizaron dos relaciones molares de péptido/ARNpi diferentes: 10:1 y 20:1.

30 Como se muestra en la tabla 5, a relaciones molares de 10:1 o 20:1, el péptido de ADGN formó partículas estables con G1 y G2 que tenían un diámetro medio de 135 nm y un índice de polidispersidad de 0,25. Las partículas mantuvieron su distribución de tamaños (diámetro medio < 130 nm e índice de polidispersidad < 0,3) y permanecieron estables con el paso del tiempo.

35 Las mediciones de las cargas de las partículas de péptido/G1 y péptido/G2 mediante el potencial zeta fueron similares para las relaciones molares de 10:1 y 20:1, con valores medios de 10,4 ± 3,1 y 8,4 ± 2,0 mV, respectivamente.

Tabla 5: Partículas de péptido de ADGN/ARNss en diferentes condiciones

	12h				24h			
	4 °C		20 °C		4 °C		20 °C	
	Tamaño (nm)	PI						
péptido/G 1 (10:1)	132	0,29	126	0,31	137	0,23	130	0,26
péptido/G1 (20:1)	126	0,27	122	0,25	141	0,35	144	0,41
péptido/G2 (10:1)	127	0,3	132	0,3	144	0,3	137	0,3
péptido/G2 (20:1)	145	0,3	141	0,32	150	0,42	151	0,35

Ejemplo 2.4: Aplicación de complejos de péptido/ARNpi para SPARC en cepas de fibroblastos humanos primarios *in vitro* para simular un modelo de fibrosis *in vitro*

Se complejaron dos ARNpi para SPARC (A y B) con péptido de ADGN como se ha descrito anteriormente. Se cultivaron dos conjuntos de cepas de fibroblastos humanos primarios (A y B) y se trataron con los dos complejos de péptido/ARNpi para SPARC diferentes a una concentración de 40 nM durante 48 horas. Se usó como tratamiento de control negativo ARNpi no diana. Se examinó la expresión de SPARC mediante RT-PCR en tiempo real. Los experimentos se realizaron por duplicado (A1, A2 y B1, B2, véase la FIG. 2). Se observó un silenciamiento génico mayor del 80 % de SPARC para cada ARNpi para SPARC en ambas líneas celulares de fibroblastos.

Ejemplo 3: Evaluación de la toxicidad de péptidos de ADGN y complejos de péptido/ARNpi en células HeLa y Jurkat

Se evaluó la toxicidad del péptido de ADGN y del complejo de péptido de ADGN/ARNpi a relaciones molares tanto 20:1 como 40:1 usando el ensayo de MTT y monitorizando el nivel de ARNm para ciclofilina medido mediante la tecnología Quantigen™ (Affymetrix). Los experimentos se realizaron por duplicado.

Los datos se correlacionaron bien entre los dos métodos y no se observó toxicidad para los complejos de péptido de ADGN/ARNpi hasta 50 µM (FIG. 3A y 3B). Se observó una caída en la viabilidad o los niveles de ARNm de ciclofilina de aproximadamente el 20-30 % con péptido libre a 50 µM.

Ejemplo 4: Aplicación *in vivo* de partículas de péptido de ADGN/ARNpi

Ejemplo 4.1

Se usaron complejos de péptido de ADGN/ARNpi para el suministro *in vivo* de ARNpi que se dirige a ciclina B1, GAPDH y Cdc20. La inyección cada tres días de péptido de ADGN/ARNpi para ciclina B1 previno el crecimiento de tumores de colon en modelos de xenoinjertos de ratón.

Se inocularon 1×10^6 células PC3 (cáncer de próstata) o HT-29 (cáncer de colon) en 100 µl de PBS por vía subcutánea en ratones desnudos atímicos hembra (6-8 semanas de edad). De dos a tres semanas después del implante de tumor, cuando el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 100 mm³, se trató a los animales mediante inyección intratumoral o intravenosa, cada 3 días, con una solución de 0,1 ml de 50 o 100 µg de ARNpi para Cyc-B1 libre (SEQ ID NO: 32), ARNpi de control o 5 o 10 µg de ARNpi para Cyc-B3 (SEQ ID NO: 34) o Cyc-B1 complejado con el péptido de ADGN. Se prepararon las soluciones madre de partículas en agua y fueron estables durante al menos tres semanas a 4 °C. Las partículas pueden almacenarse para su almacenamiento a largo plazo; en ese caso, se añadió glucosa o manitol del 5 al 20 % a la solución de partículas antes de la liofilización para estabilizar las partículas durante el proceso. Antes de la administración, se diluyeron las partículas en condiciones fisiológicas (NaCl al 0,9 % y manitol del 5 al 20 %). El diámetro tumoral se midió en dos dimensiones a intervalos regulares usando un calibre digital y se calculó el volumen tumoral como largo x ancho x alto x 0,52. Las curvas muestran el valor medio del tamaño tumoral en una cohorte de seis animales y no se observó la muerte de ningún animal o cualquier signo de toxicidad. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las regulaciones nacionales y fueron aprobados por el comité de ética de experimentación con animales local. La significación estadística de los resultados se calculó mediante la prueba de la t de Student y se consideró que $p < 0,05$ era estadísticamente significativo.

Después de la administración intravenosa sistémica de las partículas de péptido/ARNpi para ciclina B1, se observó una reducción significativa en el tamaño tumoral de HT-29 en el día 48, con una inhibición del 65 % y el 90 % con 5 µg y 10 µg de ARNpi, respectivamente (FIG. 4). Estos resultados, junto con la ausencia de actividad antitumoral del péptido/ARNpi desparejado (10 µg) o del vehículo peptídico solo, resalta la robustez y especificidad de la respuesta biológica asociada con el suministro sistémico de ARNpi para ciclina B1.

La combinación de ARNpi para ciclina B1 y Cdc20 en las partículas peptídicas previene el crecimiento de tumores de

colon en los modelos de xenoinjerto de ratón, tras la inyección cada tres días de complejos de péptido/ARNpi. Se inyectaron cinco μg (0,25 mg/kg) de ARNpi para Cyc-B1, ARNpi para Cdc20 (SEQ ID NO: 36) y una mezcla de 5 μg de ARNpi para Cyc-B1/Cdc20 (0,125 mg/kg cada uno) en partículas de péptido/ARNpi por vía intravenosa cada tres días en ratones portadores de xenoinjertos de tumores. Se observó una reducción significativa en el tamaño tumoral de HT-29 en el día 50, con una inhibición del 51 % y del 38 % con 5 μg de ARNpi para Cyc-B1 y ARNpi para Cdc20, respectivamente (FIG. 5). Se obtuvo una reducción notable del 94 % para los complejos de péptido/ARNpi para cyc-B1/cdc20 (FIG. 5), lo que sugiere efectos sinérgicos o aditivos del uso de estos dos genes como diana. Estos resultados juntos demostraron la capacidad de las partículas de péptido de ADGN/ARNpi para suministrar *in vivo* un cóctel de ARNpi asociados con una robusta respuesta biológica.

Ejemplo 4.2: Obtención de imágenes *in vivo* de la biodistribución de ADGN-100/ARNpi

Se llevó a cabo la obtención de imágenes de fluorescencia *in vivo* como se ha descrito anteriormente (Rome et al., Methods Mol. Biol. 948:49-65, 2013). Los experimentos se llevaron a cabo usando ARNpi marcado con Alexa700 en complejo con ADGN-100 a una relación molar 20:1. La farmacocinética se evaluó en ratones BALB/c normales y portadores de tumor HT-29. Se administró por vía intravenosa (IV) o subcutánea (SC) a ratones una sola dosis de 0,5 mg/kg de ARNpi marcado fluorescentemente con Alexa700 (200 μl) ya sea desnudo o en complejo con ADGN-100 (n= 4 animales por grupo). Se iluminó a ratones anestesiados usando isoflurano al 2 % con diodos emisores de luz a 663 nm equipados con filtros de interferencia. Se grabó un video de los primeros 15 minutos después de la administración y se tomaron imágenes de fluorescencia cada hora durante 5 horas y después tras 24 horas usando una cámara CCD enfriada retrodegradada como se ha descrito previamente (Rome et al., citado anteriormente; Crombez et al., Nucleic Acids Res. 37(14):4559-4569, 2009). A las 12 o 24 horas, se sacrificó a los ratones y se extrajeron diferentes órganos para la cuantificación de la fluorescencia del Alexa. Los análisis de los ratones completos se llevaron a cabo después de 1, 2, 5, 10 y 24 horas. Se recogieron muestras de sangre y tejido (hígado, bazo, riñón, pulmón, cerebro, corazón, piel, páncreas y ganglio linfático) a las 12 y 24 horas después de iniciarse la dosis de dos animales. El nivel de ARNpi se cuantificó como unidades de fluorescencia/mg de tejido para los ratones sanos y portadores de tumores.

Se evaluaron las partículas basadas en ADGN-100 usando administración sistémica tanto intravenosa como subcutánea. El análisis cinético demostró que el nivel de ARNpi en los diferentes tejidos alcanzó un máximo después de 2-3 horas tras una sola inyección intravenosa o subcutánea de partículas de ADGN-100/ARNpi (FIG. 6). La administración intravenosa del complejo de ADGN-100/ARNpi permitió el suministro del ARNpi a la mayoría de los tejidos analizados, a niveles significativos en pulmón, riñón, bazo, ganglio linfático, hígado, páncreas y músculo y niveles menores en corazón y cerebro (FIG. 7A). La administración intravenosa también permitió el suministro significativo del ARNpi a tejido tumoral (FIG. 7B). La administración subcutánea del complejo de ADGN-100/ARNpi permitió el suministro significativo del ARNpi a músculo, piel, bazo e hígado (FIG. 7C).

Ejemplo 4.3: Suministro *in vivo* de ARNpi que silencia al Factor VII

Se evaluó el péptido de ADGN-100 para el suministro *in vivo* de ARNpi que se dirige al factor de coagulación sanguínea VII expresado en hepatocitos endógeno (FVII), una diana expresada en el hígado. Las partículas de ADGN-100/ARNpi se dirigieron al hígado y ocasionaron un potente silenciamiento génico que era completamente reversible, sin incluir efectos secundarios de toxicidad o adversos en ratones.

Se prepararon soluciones madre de partículas en agua usando ARNpi no modificado (siF7 sentido: 5'-GCAAAGGCGUGCCAACUCATT-3', SEQ ID NO: 37; siF7 antisentido: 5'-TGAGUUGGCACGCCUUUGCTT-3', SEQ ID NO: 38) (Akinc et al., 2009 Molecular Therapy (2009) 17 5, 872-879) y de péptido ADGN-100 a una relación molar 20:1 de péptido/ARNpi. Se prepararon las partículas de péptido/ARNpi como se ha descrito anteriormente.

Antes de su uso *in vivo*, se evaluó primeramente la estabilidad y la eficacia de las partículas de ADGN-100/ARNpi para FVII *in vitro* en células HepG2 (Hep G2 - ATCC® HB-8065). Se hizo un seguimiento del tamaño y la polidispersidad de los complejos de ADGN-100/ARNpi en condiciones fisiológicas (NaCl al 0,9 %) después de 2, 24 y 48 horas de incubación a 4 °C y después de 1 a 4 semanas de almacenamiento a 4 °C. ADGN-100/ARNpi para FVII a una relación molar 20:1 fue estable a lo largo de un periodo de tiempo de 4 semanas con un diámetro medio de 130 nm y un índice de polidispersidad (PI) de 0,31 (tabla 6). La eficacia de las partículas para el silenciamiento génico (KD) de FVII se monitorizó después de 2 y 24 horas de incubación a 4 °C y después de 1 a 4 semanas de almacenamiento a 4 °C. La actividad de FVII se normalizó a las células no tratadas y los resultados de silenciamiento génico corresponden a una media de 3 experimentos separados. El ARNpi para FVII a una concentración de 100 nM en complejo con ADGN-100 dio lugar a un silenciamiento génico de FVII de aproximadamente el 65 % en células HepG2.

Tabla 6: Evaluación de la estabilidad y eficacia de las partículas de ADGN-100/ARNpi para FVII con el paso del tiempo

	2 horas	1 día	7 días	15 días	22 días	30 días
Tamaño medio (nm)	120 ± 5	131 ± 7	138 ± 12	131 ± 25	137 ± 10	144 ± 22
Índice de PI	0,33 ± 0,1	0,31 ± 0,5	0,31 ± 0,4	0,37 ± 0,7	0,41 ± 0,8	0,38 ± 0,7
KD de FVII(%)	71 ± 12	68 ± 10	51 ± 14	51 ± 2	63 ± 11	65 ± 4

5 Para los experimentos *in vivo*, se diluyeron las partículas en condiciones fisiológicas (NaCl al 0,9 % y manitol del 5 al 20 %). Se trató a ratones BALB/c (6-8 semanas de edad) con una sola inyección de una solución de 0,1 ml de ARNpi para siFVII libre o ARNpi para siFVII en complejo con el péptido de ADGN a 3 mg/kg (dosis de ARNpi), mediante administraciones intravenosas (vena caudal) o subcutáneas. El estudio incluyó 4 grupos de ratones: un grupo de control que recibió glucosa isotónica (C, N=2); un grupo que recibió ARNpi para Factor VII desnudo (Desnudo, N=2); un grupo que recibió la inyección subcutánea del complejo (SQ, N=3); y un grupo que recibió inyección intravenosa del complejo (IV, N=3).

10 Se recogieron muestras de suero en diversos puntos de tiempo después de la administración mediante sangrado retroorbital y se cuantificaron los niveles séricos de proteína de Factor VII en relación con los niveles de los animales tratados con control de suero salino usando un kit de actividad cromogénica basado en la actividad (BIOPHEN VII).
15 Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las regulaciones nacionales y fueron aprobados por el comité de ética de experimentación con animales local.

20 La FIG. 8A muestra los niveles de actividad media relativa de Factor VII para los tres grupos experimentales, normalizados para el grupo de control. Se midió un silenciamiento génico del 85 % y el 71 % 8 días después de la inyección para las inyecciones intravenosas y 24 días después de la inyección para las inyecciones subcutáneas, respectivamente. No se observó silenciamiento génico de FVII para la inyección de ARNpi desnudo, lo que indica que el silenciamiento génico de FVII era específico (FIG. 8A). La diferencia en la cinética del silenciamiento génico entre las vías de administración sugiere que la formulación inyectada por vía subcutánea se retrasa en el sistema linfático antes de dirigirse al hígado. Se observó una duración prolongada del silenciamiento génico con una reducción medible en la actividad del FVII hasta 60 días después de una sola inyección de ARNpi. El silenciamiento génico es reversible, iniciándose un rebote en el día 35 y el día 45 para las inyecciones intravenosas y subcutáneas, respectivamente (FIG. 8A). Se observó silenciamiento génico son inducción de cualquier efecto tóxico o secundario en ratones (FIG. 8B).

30 Tras la recuperación de los niveles séricos normales de Factor VII, correspondiente a aproximadamente 60 días después de la inyección, se volvieron a administrar dosis a los ratones. Estos resultados destacan la potencia de la tecnología de ADGN-100 para el suministro subcutáneo o intravenoso sistémico de ARNpi a hepatocitos. ADGN-100 constituye un método útil para la validación de dianas *in vivo* y es útil para el tratamiento terapéutico.

35 El suministro intravenoso (IV) proporciona una técnica para el rápido silenciamiento génico de una diana, mientras que el suministro subcutáneo (SQ) puede proporcionar una acción prolongada a lo largo de un periodo de tiempo más prolongado. Pueden usarse el suministro IV y SQ juntos para un silenciamiento génico óptimo o prolongado de las dianas deseadas. Puede seleccionarse el suministro repetido de IV, SQ o ambos modos de suministro en ciclos con una longitud adecuada (días, semanas, meses) basándose en el perfil de silenciamiento génico deseado.

40 **Ejemplo 5: Aplicaciones del péptido de ADGN para el suministro de ADN y genes**

Ejemplo 5.1: El péptido de ADGN estabiliza la estructura de hélice superenrollada del ADN en solución.

45 No se observaron cambios en el tamaño y la polidispersidad de ADGN-100/ADN plasmídico tras la incubación a 20 °C (tabla 7). Se midió el porcentaje de ADN plasmídico superenrollado (6,2 Kb y 3,8 Kb) después de 1 y 4 días de incubación en electroforesis de gel de agarosa usando una técnica convencional (tabla 8 y tabla 9). El péptido de ADGN estabilizó completamente la estructura superenrollada del plásmido en todas las condiciones ensayadas. Se observaron resultados similares para ambos plásmidos. Por el contrario, los complejos de formulaciones de lípido con los plásmidos fueron inestables después de 4 días de almacenamiento a 4, 20 o 40 °C.

50

Tabla 7: Se hizo un seguimiento del tamaño y la polidispersidad de los complejos de ADGN-100/ADN plasmídico (6,2 Kb) en condiciones fisiológicas (NaCl al 0,9 %) después de 12/24 horas de incubación a 20 °C. Se analizaron tres relaciones molares de péptido/ADN diferentes: 10:1, 20:1 y 40:1.

	12h		24h	
	Tamaño (nm)	PI	Tamaño (nm)	PI
ADGN-100/ADN (10:1)	NO	--	NO	--
ADGN-100/ADN (20:1)	140 ± 5	0,46 ± 0,1	142 ± 5	0,44 ± 0,1
ADGN-100/ADN (40:1)	145 ± 5	0,35 ± 0,1	146 ± 5	0,42 ± 0,1

5 **Tabla 8:** Porcentaje de plásmido de ADN superenrollado (6,2 Kb) medido después de 1 y 4 días de almacenamiento medido en electroforesis de gel de agarosa usando técnicas convencionales.

	nivel de plásmido superenrollado de 6,2 Kb (%)					
	1 Día			4 Días		
	4 °C	20 °C	40 °C	4 °C	20 °C	40 °C
Solo ADN	58	62	53	45	56	41
péptido/ADN	100	100	100	100	100	100
Lipofectamina	100	100	89	78	81	67

Tabla 9: Porcentaje de plásmido de ADN superenrollado (3,8 Kb) medido después de 1 y 4 días de almacenamiento medido en electroforesis de gel de agarosa usando técnicas convencionales.

	nivel de plásmido superenrollado de 3,8 Kb (%)					
	1 Día			4 Días		
	4 °C	20 °C	40 °C	4 °C	20 °C	40 °C
Solo ADN	68	58	61	54	66	59
péptido/ADN	100	100	100	100	100	100
Lipofectamina	100	95	91	82	71	72

10

Ejemplo 5.2: Estabilidad de las nanopartículas de ADN/péptido frente al tratamiento con heparina

Se evaluó la resistencia de las partículas de ADN/péptido y los controles al tratamiento con heparina después de 1 y 4 días de incubación a 4 °C, 20 °C y 40 °C. Se trató el plásmido libre y las formulaciones de péptido o lípido con heparina (5 µg) durante 1 hora a 32 °C, y después se analizó el nivel de plásmido libre en electroforesis en gel de agarosa. Las partículas de péptido/plásmido se formularon a una relación molar de 20:1 con el plásmido de 6,2 Kb. Como se muestra en la tabla 10, el porcentaje de plásmido libre fue bajo para los complejos de péptido/ADN después de 1 y 4 días de incubación a diversas temperaturas y posterior tratamiento con heparina. Este resultado demuestra que en las partículas de péptido/plásmido, las interacciones de plásmido/péptido implicaron principalmente restos de arginina, lo que posibilita complejos estables que no se asocian mediante tratamiento con heparina. Por el contrario, las formulaciones en lípidos de plásmidos fueron inestables con el tratamiento con heparina, con un alto porcentaje de plásmido libre liberado (tabla 10).

25 **Tabla 10:** Porcentaje de plásmido libre medido después de 1 y 4 días de almacenamiento y tratamiento con heparina medido en electroforesis en gel de agarosa usando técnicas convencionales.

	Plásmido libre (%)					
	1 Día			4 Días		
	4 °C	20 °C	40 °C	4 °C	20 °C	40 °C
Solo ADN	100	100	100	100	100	100
péptido/ADN	14	0	0	18	10	10
Lipofectamina	78	67	87	82	71	69

Ejemplo 5.3: Las partículas de péptido de ADGN/ADN plasmídico promueven el suministro génico:

30 Se evaluó la eficacia de la expresión de luciferasa en células HeLa tras el almacenamiento de las nanopartículas de péptido/plásmido a 20 °C (tabla 11) o 40 °C (tabla 12) durante 1 y 4 días. Se comparó la eficacia del suministro del plásmido mediado por péptido con plásmido libre o usando una formulación de lípido (Lipofectamine 2000, Invitrogen). Se obtuvieron resultados con plásmidos de 6,2 y 3,8 Kb. Las partículas de péptido de ADGN/ADN plasmídico

5 promovieron el suministro génico, como se evidencia por la alta expresión de luciferasa, sin una influencia significativa del tamaño del plásmido. Los péptidos de ADGN mediaron una elevada expresión de luciferasa incluso después de 4 días de incubación de las nanopartículas antes de la transfección. Por el contrario, se redujo significativamente la eficacia de la formulación de lípido para mediar el suministro génico y la expresión de luciferasa se redujo significativamente después de 4 días de almacenamiento de las nanopartículas a 20 °C y 40 °C.

Tabla 11: Eficacia de la expresión génica a las 48 horas medida en células HeLa después de 1 y 4 días de almacenamiento de nanopartículas de péptido/plásmido a 20 °C:

	Expresión de luciferasa (URL)			
	Plásmido de 6,2 Kb		Plásmido de 3,8 Kb	
	1 Día	4 Días	1 Día	4 Días
Solo ADN	$0,1 \cdot 10^2$	$2,4 \cdot 10^2$	$5,3 \cdot 10^1$	$1,5 \cdot 10^2$
Lipofectamina	$1,5 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^4$	$4,7 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^5$
péptido/ADN	$5,5 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^6$	$4,8 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^6$

10 **Tabla 12:** Eficacia de la expresión génica medida en células HeLa a las 48 horas después de 1 y 4 días de almacenamiento de las nanopartículas de péptido/plásmido a 40 °C

	Expresión de luciferasa (URL)			
	Plásmido de 6,2 Kb		Plásmido de 3,8 Kb	
	1 Día	4 Días	1 Día	4 Días
Solo ADN	$0,2 \cdot 10^2$	$0,4 \cdot 10^2$	$0,3 \cdot 10^2$	$0,5 \cdot 10^2$
Lipofectamina	$3,2 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^4$
péptido/ADN	$2,1 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^6$

Ejemplo 6: Transferencia génica mediada por ADGN-100 en linfocitos T

15 Ejemplo 6.1

Los péptidos ADGN-100 (Ac-KWRSAGWRWRLWRVRSWSR-cisteamida; SEQ ID NO: 2, resto 1 acetilado, resto 19 unido covalentemente a la cisteamida), VEPEP-6 (Ac-LWRALWRLWRSLWRLWKA-cisteamida; SEQ ID NO: 20, resto 1 acetilado, resto 19 unido covalentemente a la cisteamida) y VEPEP-9 (Ac-LRWWLRWASRWFSRWAWWR-cisteamida, SEQ ID NO: 26, resto 1 acetilado, resto 19 unido covalentemente a la cisteamida) se evaluaron para el suministro génico en linfocitos T, incluyendo células Jurkat, 293T y K562, usando un plásmido que expresa luciferasa. Para estudiar el suministro génico estable, se usó un plásmido que expresaba YFP y que contenía un marcador de selección positiva para genética (G418). Se observó que ADGN-100 y VEPEP-9 permitían una transfección potente de linfocitos T, así como para la generación de líneas celulares transformadas estables que expresan YFP.

25 **Materiales y métodos**

Se obtuvieron líneas celulares de la ATCC: Jurkat, Clon E6-1 (ATCC® TIB-152™), 293T/17 [HEK 293T/17] (ATCC® CRL-11268) y K562 (ATCC® CCL243™). Las células se cultivaron en matraces de 75 cm² y placas de 6 pocillos en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía suero fetal bovino a una concentración final del 10 %. Las células se pasaron cada 4 días y se pasaron nuevamente 24 horas antes de la transfección. Se prepararon soluciones madre de los péptidos ADGN-100, VEPEP-6 y VEPEP-9 a 2 mg/ml en agua destilada y se sometieron a ultrasonidos durante 10 min en un sonicador de baño de agua, y después se diluyeron antes de su uso. Las soluciones madre de plásmido se prepararon a concentraciones de 100 µM en Tris 50 mM, EDTA 0,5 mM.

35 Las nanopartículas se prepararon mezclando péptido (solución madre 400 µM) y plásmido (solución madre 100 µM) en agua pura durante 30 min a 37 °C, con relaciones molares finales de péptido a plásmido de 10:1 o 20:1 con 1 ng o 5 ng de ADN plasmídico. Después, se centrifugaron las soluciones de complejo durante 5 min a 9000 rpm para retirar cualquier precipitado y se diluyeron en solución de PBS al 50 % justo antes de la transfección. Se obtuvieron plásmidos que codificaban luciferasa (6,2 Kb) e YFP (6,3 Kb) de New England BioLabs (EE. UU.) y Sigma (EE. UU.), respectivamente y se volvieron a clonar.

45 Se volvieron a pasar las células 24 horas antes de la transfección. Se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS. Las células se incubaron durante 5 min con 0,2 o 0,4 ml de solución de plásmido/péptido, y después se añadieron 0,4 ml de medio sin suero. Después de 30 min, se añadieron 1,2 ml de medio completo y se ajustó el nivel de suero al 10 %. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 48 horas y después se determinó la expresión de YFP o luciferasa mediante ensayo colorimétrico, FACS y microscopía de fluorescencia.

Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se cultivaron las células en medio de crecimiento completo que contenía varias concentraciones de G418: 0, 100, 200, 500, 800 o 1000 µg/ml. Durante dos semanas, se reemplazó el medio que contenía fármaco cada 4 días (o según necesidad). Durante la segunda semana, se seleccionaron "islas" de células supervivientes. Después, se seleccionaron colonias respecto de la expresión del indicador.

5

Expresión génica mediada por ADGN-100 en diferentes líneas de linfocitos T

Se evaluó la eficacia de la expresión de YFP y luciferasa para las 3 líneas celulares (Jurkat, 293T y K562) usando 1 y 5 ng de complejos de plásmido con los diferentes péptidos a una relación molar de 10:1 y 20:1. Se monitorizó la expresión de luciferasa mediante ensayo colorimétrico (FIG. 9) y la expresión de GFP se monitorizó mediante FACS (tabla 13, FIG. 10). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado usando o plásmido libre, lipofectamina (sistema de suministro a base de lípido, Invitrogen) o péptidos libres como control.

10

Tabla 13: Porcentajes de células positivas para YFP según se monitoriza mediante FACS

Tipo de célula	Jurkat				293T				K562			
	10:1		20:1		10:1		20:1		10:1		20:1	
	ADN (ng)	1	5	1	5	1	5	1	5	1	5	
Plásmidos	0	0	0	5±5	0	0	5±5	10±5	0	0	0	0
Lipofectamina	-	-	15±5	34±8	-	-	10±5	21±3	-	-	13±5	17±2
ADGN (0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ADGN-100	5±5	25±5	37±5	89.±8	11±2	19,6±5	36,5±3	76,5±5	10±5	20±4	35±4	68±5
VEPEP-9 (0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VEPEP-9	0	20±5	12±5	79.±5	0	20±5	25±4	70±5	4±5	17±5	16±5	51±7
VEPEP-6(0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VEPEP-6	0	0	5±5	13±5	0	0	5±1	8±5	0	0	2±5	5±1

15

No se observó expresión de YFP o luciferasa usando 1 ng de plásmido libre y solo se observó de un 5 a un 10 % de células positivas usando 5 ng de plásmido libre para la transfección. No se observó expresión de YFP o luciferasa para las tres líneas celulares con transfección mediada por VEPEP-6, usando 1 o 5 ng de plásmido. Por el contrario, se observó una eficaz expresión génica para las tres líneas celulares después de la transfección mediada por ADGN-100 o VEPEP-9. Se observó el mayor nivel de expresión con 5 ng de ADN complejado a una relación de péptido a plásmido de 20:1. La eficacia de la transfección varió entre un 65 a un 85 %, dependiendo de la línea celular. ADGN-100 fue 2 y 5 veces más eficaz que lipofectamina para el suministro génico en células Jurkat y 293T/K562, respectivamente.

20

Transfección estable mediada por ADGN-100 de linfocitos T.

25

Se evaluó la eficacia de la transfección mediada por ADGN-100 para producir clones estables que expresan YFP para linfocitos T tanto 293T como K562. Las células se transfectaron con 5 ng de plásmido en complejo con ADGN-100 a una relación molar 20:1. La transfección se llevó a cabo en medio completo (FCS al 10 %) durante 48 horas y se evaluaron los clones que expresan YFP mediante citometría de flujo en diversos puntos de tiempo (2, 5, 7 y 14 días) durante 2 semanas.

30

Como se muestra en la FIG. 11, la eficacia de la transfección mediada por ADGN-100 fue de aproximadamente el 80 % para células tanto K562 como 293T y la expresión de YFP se mantuvo de manera estable a los 14 días después de la transfección, con más de un 57 % (293T) y un 65 % (K562) de células positivas a YFP. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se seleccionaron los clones que expresan YFP de manera estable mediante crecimiento en medio que contenía diversas concentraciones de G418 durante 3 semanas y se analizaron mediante FACS y microscopía. Se seleccionaron varios clones individuales de células 293T que expresaban YFP y se expandieron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos hasta una alta confluencia. Todos los clones seleccionados expresaron altos niveles de YFP (FIG. 12A y 12B).

35

40

Ejemplo 6.2: Suministro génico estable en linfocitos T y producción de linfocitos T anti-CAR de CD19

Se evaluó la potencia de la tecnología de ADGN para la modificación de células y la modificación de CAR-linfocitos T. Se demostró que el péptido ADGN-100 suministra de manera eficaz un plásmido que expresa el vector anti-CAR de CD 19 en linfocitos T aislados de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y produjeron linfocitos T anti-CAR de CD 19 estables.

5

Materiales y métodos

Se aislaron linfocitos T de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 unidos a perlas paramagnéticas (Dynabeads ClinExVivo CD3/CD28, Invitrogen) a una relación de 3:1 (perlas:células). Los linfocitos T se transfectaron con partículas de ADGN-100 complejadas con un plásmido que codifica un receptor de antígeno quimérico específico para CD19 (CAR) que tiene un scFv específico para CD19 unido a restos de señalización de CD28 y CD3z y bajo el control de un promotor de CMV. Los linfocitos T se transfectaron por incubación con complejo de péptido/plásmido a 2 relaciones (20:1 y 30:1) durante 48 horas.

10

15

En el día 4, se analizó el nivel de células transfectadas y se transfirieron las células a medio de expansión de linfocitos T fresco (medio AIM V complementado con AB sérica humana al 5 % inactivada por calor, Gluta-Max al 1 %, 300 UI/ml de IL-2). En el día 12, se recogieron las células usando perlas paramagnéticas anti-CD3/anti-CD28 con el imán Dynal ClinExVIVO MPC (Invitrogen), se lavaron y se analizó su viabilidad y expresión de anti-CD 19 mediante citometría de flujo. La expresión del CAR anti-CD 19 en los linfocitos T se evaluó mediante citometría de flujo usando un ensayo de proteína L. Se adquirió proteína L biotinilada de ThermoScientific, se reconstituyó en agua estéril a una concentración madre de 50ng/μl y se almacenó a 4 °C. 7-AAD (Sigma) se usó para determinar la viabilidad.

20

Resultados

25

ADGN-100 medió una transfección del vector de CAR anti-CD 19 en linfocitos T aislados de PBMC con una eficacia del 57 % y del 63 % a relaciones de péptido a plásmido de 20:1 y 30:1, respectivamente (FIG. 13). Los resultados se normalizaron a células no transfectadas y se compararon con linfocitos T incubados con plásmido libre. La expresión estable se mantuvo a lo largo de 12 días en un 41 % y un 48 % de las células a relaciones molares de péptido/plásmido de 20:1 y 30:1, respectivamente. La viabilidad media fue de aproximadamente el 80 % o mayor en todas las condiciones, lo que indica que no se asignó toxicidad con la transfección de ADGN-100 (FIG. 14). Los resultados se normalizaron a células no transfectadas y se compararon con linfocitos T incubados con plásmido libre. Estos resultados demuestran que la tecnología de ADGN-100 con un vector no vírico para la transfección puede usarse eficazmente para producir linfocitos T específicos de diana para terapias basadas en inmunidad, tales como terapias anticáncer que emplean linfocitos T dirigidos a tumores.

30

35

Ejemplo 7: Comparación de ADGN-100 con otros péptidos penetrantes en células anfipáticos secundarios (CADY/VEPEP-6/VEPEP-9)

Solo 4 de los 19 restos están compartidos entre los péptidos ADGN-100 y los péptidos CADY, VEPEP-6 o VEPEP-9.

40

Comparación de la estructura secundaria

Se determinaron las estructuras secundarias usando el programa de modelado molecular Peplook-Zultim (Thomas A y Brasseur R., 2006, Prediction of peptide structure: how far are we?, Proteins. 65, 889-97). Los cuatro péptidos adoptan una conformación helicoidal anfipática secundaria en los ambientes que imitan a la membrana, exponiendo los grupos Trp en un lado, los restos cargados en el otro y los restos hidrófobos en otro más (FIG. 15). CADY y VEPEP-6 adoptan la misma estructura secundaria, con un motivo helicoidal en el núcleo y los extremos C y N-terminales del péptido (tabla 14). Por el contrario, los péptidos ADGN-100 y VEPEP-9 contienen un solo motivo helicoidal central, que es más largo en VEPEP-9 y de acuerdo con Konate et al., 2010 (Biochemistry), Crowlet et al 2014 (BBA).

45

50

Tabla 14

Péptido	Predicción de estructura secundaria
ADGN-100	KWRSAGWRWRLWRVRSWSR hhhhhhhhhhhhhh
CADY	GLWRALWRLLRSLWRLLLWKV hhh hhhhh hhhh

(continuación)

Péptido	Predicción de estructura secundaria
VEPEP-6	LWRALWRLWRSLLWRLWKA hhh hhhhh hhhh
VEPEP-9	LRWWLRWASRWF'SRWAWWR hhhhhhhhhhhhhhhhhh

h: motivo de hélice

Comparación del tamaño de nanopartículas

5 VEPEP-6, CADY y VEPEP-9, a una relación molar 20:1 (péptido:ARNpi), forman nanopartículas con el ARNpi, con un intervalo de tamaño entre 100-200 nm y un diámetro medio centrado a 150 nm y una superficie cargada positivamente (potencial zeta de 40 mV, 25 mV y 17 mV para las partículas a base de CADY, VEPEP-6 y VEPEP-9, respectivamente).

10 El péptido ADGN-100 forma partículas más pequeñas, con un diámetro medio < 130 nm y un índice de polidispersidad < 0,31. Además, la carga de la partícula de ADGN-100/ARNpi es más próxima a la neutralidad, con un potencial zeta de 6,0 ± 0,8 mV. Esta es una ventaja importante para las aplicaciones *in vivo*.

Toxicidad

15 No se observó toxicidad para los complejos de ADGN-100/ARNpi CADY/ARNpi hasta 50 µM y se obtuvo una toxicidad del 30 % con ADGN-100 libre y CADY a 50 µM (FIG. 16). VEPEP-6 muestra más toxicidad que los otros péptidos en forma tanto complejada (toxicidad del 10 %) como libre (muerte celular del 40 %) a 50 µM. No se observó toxicidad para los complejos de VEPEP-9/ARNpi y a diferencia de ADGN-100, VEPEP-9 muestra más toxicidad en su forma libre (muerte celular del 40 %) a 50 µM, que puede atribuirse a la estructura helicoidal más larga de VEPEP-9.

20 **Suministro génico *in vitro***

Los péptidos VEPEP-6, VEPEP-9, CADY y de ADGN forman complejos con ADN plasmídico. Se evaluó la eficacia de los péptidos para estabilizar el ADN plasmídico de 6,2 Kb efectuando un seguimiento tanto de la integridad de la estructura de hélice superenrollada del plásmido como de la estabilidad de las partículas de ADN/péptido después del tratamiento con heparina tras 1 o 4 días de incubación a 4 °C, 20 °C o 40 °C. Se incluyeron plásmido libre y complejo con una formulación de lípido (Lipofectamine 2000, Invitrogen) por comparación. Para el tratamiento con heparina, se incubaron 5 µg de heparina con la muestra durante 1 hora a 32 °C, seguido de electroforesis en gel de agarosa para resolver el plásmido libre. Como se muestra en las tablas 15 y 16, Los péptidos VEPEP-9 y ADGN-100 estabilizaron completamente el ADN plasmídico en todas las condiciones evaluadas. ADGN-100 protegió completamente al ADN plasmídico frente a la degradación y el tratamiento con heparina. En comparación, las formulaciones de VEPEP-6 y lípido fueron poco estables después de 4 días de incubación a 4, 20 o 40 °C.

Tabla 15

Vehículo	Nivel de superenrollamiento (%)					
	Día 1			Día 4		
	4 °C	20 °C	40 °C	4 °C	20 °C	40 °C
Sin vehículo	58	62	53	45	56	41
CADY	89	89	100	85	100	100
VEPEP-6	98	87	100	100	100	87
VEPEP-9	100	100	100	100	100	100
ADGN-100	100	100	100	100	100	100
Lipofectamina	100	100	89	78	81	67

Tabla 16

Vehículo	Plásmido libre (%)					
	Día 1			Día 4		
	4 °C	20 °C	40 °C	4 °C	20 °C	40 °C
Sin vehículo	100	100	100	100	100	100
CADY	17	25	27	21	29	35
VEPEP-6	0	0	0	10	5	5
VEPEP-9	56	61	69	75	76	67
ADGN-100	12	0	0	17	10	10
Lipofectamina	78	67	87	82	71	69

Se evaluó la eficacia del suministro mediado por péptido en células HeLa midiendo la expresión de luciferasa 48 horas después del suministro usando nanopartículas de péptido/plásmido que se habían incubado a 20 °C durante 1 o 4 días. La eficacia de la expresión génica a las 48 h se midió en células HeLa después de 1 y 4 días de almacenamiento de nanopartículas de péptido/plásmido a 20 °C. En cada condición evaluada, el péptido de ADGN fue al menos 10 y 2 veces más potente que VEPEP-6 y CADY, respectivamente (tabla 17). Los péptidos de ADGN y VEPEP-9 mostraron niveles similares de eficacia de suministro del plásmido, aproximadamente 100 veces mayor que la observada con la formulación de lípido después de 4 días de incubación.

Tabla 17

Péptido/lípido	Expresión de luciferasa (URL)			
	Plásmido de 6,2 Kb		Plásmido de 3,8 Kb	
	1 día	4 días	1 día	4 días
Sin péptido/lípido	$0,10 \cdot 10^2$	$2,31 \cdot 10^2$	$5,24 \cdot 10^1$	$1,52 \cdot 10^2$
Lipofectamina	$1,51 \cdot 10^7$	$2,65 \cdot 10^4$	$4,81 \cdot 10^6$	$3,84 \cdot 10^5$
ADGN-100	$5,51 \cdot 10^6$	$4,90 \cdot 10^6$	$4,81 \cdot 10^6$	$5,90 \cdot 10^6$
CADY	$2,91 \cdot 10^6$	$3,31 \cdot 10^6$	$3,85 \cdot 10^6$	$3,12 \cdot 10^6$
VEPEP-6	$4,21 \cdot 10^5$	$2,71 \cdot 10^4$	$4,41 \cdot 10^5$	$1,65 \cdot 10^5$
VEPEP-9	$1,70 \cdot 10^7$	$4,50 \cdot 10^6$	$5,42 \cdot 10^6$	$1,21 \cdot 10^7$

Suministro intracelular in vitro

El microARN miR-34a humano se ha relacionado recientemente con el cáncer, particularmente con su expresión en relación con el estatus de TP53. Se usaron partículas de péptido de ADGN-100 o VEPEP-6/miRNA-34 en un ensayo antiproliferación con células de cáncer de mama MCF7. Se añadió miRNA-34 monocatenario (UGGCAGUGUGGUUAGCUGGUUG, SEQ ID NO: 41) a las células cultivadas libre de péptido o en partículas de péptido/miARN con ADGN-100 o VEPEP-6 a una relación de péptido:miARN de 20:1. Se evaluaron las respuestas a las dosis de miARN-34 (barras grises), partículas de VEPEP-6/miARN-34 (barras blancas) y partículas de ADGN-100/miARN-34 (barras negras) (FIG. 17). ADGN-100 aumentó en gran medida la propiedad antiproliferativa de miARN-34, que tiene una CI₅₀ de 81 nM.

Suministro intracelular in vivo

Se usaron partículas de ARNpi complejadas con ADGN, VEPEP-6 o VEPEP-9 para administración intravenosa sistémica. Se inyectaron cinco o diez µg (0,25 mg/kg o 0,5 mg/kg) de ARNpi para Cyc B1 en partículas con péptido de ADGN, partículas con VEPEP-6 o partículas con VEPEP-9 por vía intravenosa cada tres días a ratones portadores de xenoinjertos de tumores de HT-29. Se observó una reducción significativa en el tamaño tumoral después del día 50 usando 0,25 mg/kg de ARNpi, con una inhibición del 61 % y del 33 % para las partículas de ADGN y VEPEP-6, respectivamente (FIG. 18). En el día 50, se redujo la progresión tumoral en un 87 % y 65 % cuando se usaron 0,5 mg/kg de partículas de ADGN/ARNpi y VEPEP-6/ARNpi, respectivamente. Por el contrario, las partículas de VEPEP-9/ARNpi redujeron el crecimiento tumoral en solo un 12 % y un 38 % a 0,25 mg/kg y 0,5 mg/kg, respectivamente. Las partículas de ADGN/ARNpi fueron 2 y 9 veces más eficientes que las partículas de VEPEP-6 y VEPEP-9, respectivamente.

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1, ADGN-100

X₁KWRSX₂X₃X₄RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR

- SEQ ID NO: 2, ADGN-100 a**
KWR SAGWRWRLWRVRSWSR
- 5 **SEQ ID NO: 3, ADGN-100 b**
KWR SALYRWRLWRSRSWSR
- SEQ ID NO: 4, ADGN-100 c**
KWR SALYRWRLWRSALYSR
- 10 **SEQ ID NO: 5, a1 de ADGN-100**
X₁KWR SAGWRWRLWRVRSWSR
- SEQ ID NO: 6, Motivo central de ADGN**
15 RWRLWRX₅X₆X₇X₈SR
- SEQ ID NO: 7, ADGN-100 aa**
KWR S_sAGWR_sWRLWRVRSWSR
- 20 **SEQ ID NO: 8, ADGN-100 ab**
KWR_sSAGWRWR_sLWRVRSWSR
- SEQ ID NO: 9, ADGN-100 ac**
KWR SAGWR_sWRLWRV_sSWSR
- 25 **SEQ ID NO: 10, ADGN-100 ba**
KWR S_sALYR_sWRLWRSRSWSR
- SEQ ID NO: 11, ADGN-100 bb**
30 KWR_sSALYRW_sLWRSRSWSR
- SEQ ID NO: 12, ADGN-100 bc**
KWR SALYR_sWRLWRSR_sSWSR
- 35 **SEQ ID NO: 13, ADGN-100 bd**
KWR SALYRW_sLWR_sRSWSR
- SEQ ID NO: 14, ADGN-100 be**
40 KWR SALYRWRLWRS_sRSWS_sR
- SEQ ID NO: 15, ADGN-100 ca**
KWR_sSALYRW_sLWRSALYSR
- 45 **SEQ ID NO: 16, ADGN-100 cb**
KWR S_sALYR_sWRLWRSALYSR
- SEQ ID NO: 17, ADGN-100 cc**
KWR SALYRW_sLWR_sALYSR
- 50 **SEQ ID NO: 18, ADGN-100 cd**
KWR SALYRWRLWRS_sALYS_sR
- SEQ ID NO: 19, CADY**
55 GLWRALWRLLRSLWRLWLV
- SEQ ID NO: 20, VEPEP-6 a**
LWRALWRLWRSLWRLWKA
- SEQ ID NO: 21, VEPEP-6 b**
60 LWRALWRLLRSLWRLWKA
- SEQ ID NO: 22, VEPEP-6 c**
LWRALWRLWRSLWRLWKA
- 65 **SEQ ID NO: 23, VEPEP-6 d**
LWRALWRLLRALWRLWKA

SEQ ID NO: 24, VEPEP-6 e
LWRALWRLLRNLWRLLWKA

5 **SEQ ID NO: 25, VEPEP-9**
X₁X₂X₃WWX₄X₅WAX₆X₃X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂WX₁₃R

SEQ ID NO: 26, VEPEP-9 a
LRWWLRWASRWFSRWAWWR

10 **SEQ ID NO: 27, VEPEP-9 b**
LRWWLRWASRWASRWAWFR

15 **SEQ ID NO: 28, VEPEP-9 c**
RWWLRWASRWALSWRWWR

SEQ ID NO: 29, GAPDH sentido
CAUCAUCCUGCCUCUACUTT

20 **SEQ ID NO: 30, GAPDH antisentido**
AGUAGAGGCAGGGAUGAUGTT

SEQ ID NO: 31, Cyc-B1 sentido
GGCGAAGAUCAACAUGGCATT

25 **SEQ ID NO: 32, Cyc-B1 antisentido**
UGCCAUGUUGAUCUUCGCCTT

SEQ ID NO: 33, Cyc-B3 sentido
GGUGAAGAUCAGCAUGGCATT

30 **SEQ ID NO: 34, Cyc-B3 antisentido**
UGCCAUGUCGAUCUUCACCTT

35 **SEQ ID NO: 35, Cdc20 sentido**
UGCCAUGUCGAUCUUCACCTT

SEQ ID NO: 36, Cdc20 antisentido
UGCCAUGUCGAUCUUCACCTT

40 **SEQ ID NO: 37, siF7 sentido**
GCAAAGGCGUGCCAACUCATT

SEQ ID NO: 38, siF7 antisentido
TGAGUUGGCACGCCUUUGCTT

45 **SEQ ID NO: 39, G1**
CGACGACGA

50 **SEQ ID NO: 40, G2**
CGACGACGACGA

SEQ ID NO: 41, miR-34
UGGCAGUGUGGUUAGCUGGUUG

55

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de origen no natural que comprende una secuencia de aminoácidos $X_1KWRSX_2X_3X_4RWRLWRX_5X_6X_7X_8SR$ (SEQ ID NO: 1), en donde

- 5 a) X_1 es cualquier aminoácido o está ausente y en donde X_2 - X_8 son cualquier aminoácido; o
 b) X_1 es βA , S o está ausente, X_2 es A o V, X_3 es G o L, X_4 es W o Y, X_5 es V o S, X_6 es R, V o A, X_7 es S o L y X_8 es W o Y,
 opcionalmente en donde el péptido tiene 19 o 20 aminoácidos de longitud.

10 2. El péptido de la reivindicación 1, en donde el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de:

- 15 a) $KWRSAGWRWRLWRVRSWSR$ (SEQ ID NO: 2),
 b) $KWRSALYRWRLWRSRSWSR$ (SEQ ID NO: 3) o
 c) $KWRSALYRWRLWRSALYSR$ (SEQ ID NO: 4).

3. El péptido de la reivindicación 1 o 2, que además comprende

- 20 a) uno o más restos unidos covalentemente al extremo N-terminal del péptido, en donde los uno o más restos se seleccionan entre el grupo que consiste en un grupo acetilo, un grupo estearilo, un ácido graso, un colesterol, un polietilenglicol, una señal de localización nuclear, una señal de exportación nuclear, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo, un péptido, un polisacárido y una molécula de direccionamiento; y/o
 b) uno o más restos unidos covalentemente al extremo C-terminal del péptido, en donde los uno o más restos se seleccionan entre el grupo que consiste en un grupo cisteamida, una cisteína un tiol, una amida, un ácido nitrilotriacético, un grupo carboxilo, un grupo alquilo C_1 - C_6 lineal o ramificado, una amina primaria o secundaria, un derivado osídico, un lípido, un fosfolípido, un ácido graso, un colesterol, un polietilenglicol, una señal de localización nuclear, una señal de exportación nuclear, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo, un péptido, un polisacárido y una molécula de direccionamiento, opcionalmente en donde el péptido comprende un grupo acetilo unido covalentemente a su extremo N-terminal y/o un grupo cisteamida unido covalentemente a su extremo C-terminal.

4. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el péptido comprende dos restos separados por tres o seis restos que están unidos por un enlace hidrocarburo, opcionalmente en donde el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de:

- 35 aa) $KWRS_sAGWR_sWRLWRVRSWSR$ (SEQ ID NO: 7),
 ab) $KWR_sSAGWRWR_sLWRVRSWSR$ (SEQ ID NO: 8),
 ac) $KWRSAGWR_sWRLWRVRS_sWSR$ (SEQ ID NO: 9),
 40 ba) $KWRS_sALYR_sWRLWRSRSWSR$ (SEQ ID NO: 10),
 bb) $KWR_sSALYRWRL_sLWRSRSWSR$ (SEQ ID NO: 11),
 bc) $KWRSALYR_sWRLWRSR_sWSR$ (SEQ ID NO: 12),
 bd) $KWRSALYRWRL_sLWRS_sRSWSR$ (SEQ ID NO: 13),
 be) $KWRSALYRWRLWRS_sRSWS_sR$ (SEQ ID NO: 14),
 45 ca) $KWR_sSALYRWRL_sLWRSALYSR$ (SEQ ID NO: 15),
 cb) $KWRS_sALYR_sWRLWRSALYSR$ (SEQ ID NO: 16),
 cc) $KWRSALYRWRL_sLWRS_sALYSR$ (SEQ ID NO: 17) o
 cd) $KWRSALYRWRLWRS_sALYS_sR$ (SEQ ID NO: 18),

50 en donde los restos marcados con un subíndice "s" son los dos restos unidos por el enlace hidrocarburo.

5. Un complejo que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y una molécula de carga.

6. Una nanopartícula que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y una molécula de carga.

55 7. El complejo de la reivindicación 5 o la nanopartícula de la reivindicación 6, en donde la molécula de carga es

- 60 a) un ácido nucleico;
 b) un ARNpi, un miARN, un plásmido de ADN o un análogo de los mismos;
 c) un oligonucleótido;
 d) un ARN monocatenario, un ADN monocatenario, un ARN bicatenario, un ADN bicatenario o un derivado de los mismos,
 opcionalmente en donde la carga tiene
 65 i) de aproximadamente 2 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud;
 ii) hasta aproximadamente 100 nucleótidos de longitud; o
 iii) más de aproximadamente 100 nucleótidos de longitud.

8. La nanopartícula de la reivindicación 6 o 7, en donde

- 5 a) la relación molar de la molécula de carga al péptido en la nanopartícula es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:80, opcionalmente en donde la relación molar de la molécula de carga al péptido en la nanopartícula es de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:40;
- 10 b) la molécula de carga está en complejo con una molécula de ensamblaje para formar un núcleo de la nanopartícula, opcionalmente en donde la molécula de ensamblaje se selecciona entre el grupo que consiste en un péptido, una proteína, un anticuerpo, un lípido, un fosfolípido, un polímero, un aptámero, una nanopartícula, un liposoma, un dendrímero, un polimerosoma, un vector vírico y una micela;
- c) la nanopartícula comprende además una capa superficial, opcionalmente en donde la capa superficial comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4;
- d) la nanopartícula comprende un resto de direccionamiento en la superficie, opcionalmente en donde el péptido está unido covalentemente al resto de direccionamiento;
- 15 e) el diámetro medio de la nanopartícula es de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 300 nm, opcionalmente en donde el diámetro medio de la nanopartícula es de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 200 nm o de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 140 nm; y/o
- 20 f) el valor absoluto del potencial zeta es menor de aproximadamente 30 mV, opcionalmente en donde el valor absoluto del potencial zeta es menor de aproximadamente 10 mV.

9. La nanopartícula de la reivindicación 8, en donde la nanopartícula comprende además una capa superficial y una capa intermedia, opcionalmente en donde la capa intermedia comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

25 10. Una composición farmacéutica que comprende el complejo de la reivindicación 5 o 7 o la nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 6-9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en donde

- 30 a) la composición farmacéutica se formula para administración intravenosa, intratumoral, intraarterial, tópica, intraocular, oftálmica, intracraneal, intratecal, intravesicular, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intranasal, intratraqueal, pulmonar, intracavidad u oral;
- 35 b) el vehículo farmacéuticamente aceptable es un azúcar o una proteína, opcionalmente en donde el azúcar se selecciona entre el grupo que consiste en sacarosa, glucosa, manitol y una combinación de los mismos y está presente en la composición farmacéutica a una concentración de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 20 %; y/o la proteína es albúmina; y/o
- c) la composición farmacéutica está liofilizada.

40 12. Un método para preparar la nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, que comprende:

- a) combinar una composición que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 con una composición que comprende la molécula de carga para formar una mezcla; y
- b) incubar la mezcla para formar la nanopartícula.

45 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 u 11 para su uso como medicamento.

50 14. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 u 11 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, fibrosis, enfermedades infecciosas víricas, enfermedades hereditarias y enfermedades del envejecimiento y degenerativas.

55 15. Un método para administrar una molécula en una célula que comprende poner en contacto la célula con el complejo de la reivindicación 5 o 7 o la nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en donde el complejo o la nanopartícula comprende la molécula y en donde la puesta en contacto de la célula con el complejo o la nanopartícula se lleva a cabo *ex vivo* o *in vitro*.

60 16. El método de la reivindicación 15, en donde la célula es un granulocito, un mastocito, un monocito, una célula dendrítica, un linfocito B, un linfocito T o una célula citolítica natural.

65 17. El método de la reivindicación 16, en donde

- a) la molécula es un plásmido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une específicamente a un antígeno diana, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular, opcionalmente en donde el antígeno diana es un antígeno asociado con el cáncer y/o
- i) el complejo o la nanopartícula comprende además un ARNpi; o ii) el método comprende además poner en contacto la célula con un complejo de acuerdo con la reivindicación 5 o 7 o una nanopartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en donde el complejo o la nanopartícula comprende un ARNpi; o

b) la molécula es un ARNpi.

- 5 18. Una célula que comprende el complejo de las reivindicaciones 5 o 7 o la nanopartícula de las reivindicaciones 6-9 preparada de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 15-17 para su uso como medicamento, opcionalmente en donde la célula modificada se va a administrar por una vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intravesicular, subcutánea, intratecal, intrapulmonar, intramuscular, intratraqueal, intraocular, transdérmica, oral o por inhalación.
- 10 19. Una célula modificada que comprende el complejo de la reivindicación 5 o 7 o la nanopartícula de las reivindicaciones 6-9 preparada de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 15-17 para su uso en el tratamiento del cáncer, opcionalmente en donde la célula modificada se va a administrar por una vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intravesicular, subcutánea, intratecal, intrapulmonar, intramuscular, intratraqueal, intraocular, transdérmica, oral o por inhalación.
- 15 20. Un método para estabilizar un ácido nucleico que comprende:
- 20 a) combinar una composición que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 con una composición que comprende el ácido nucleico para formar una mezcla; y
- b) incubar la mezcla para formar un complejo que comprende el ácido nucleico.
- 25 21. Un kit que comprende una composición que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 e instrucciones para preparar el complejo de la reivindicación 5 o 7 y/o la nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, opcionalmente en donde el kit comprende además una composición que comprende una molécula ensamblada seleccionada entre el grupo que consiste en un péptido, una proteína, un anticuerpo, un lípido, un fosfolípido, un polímero, un aptámero, una nanopartícula, un liposoma, un dendrímero, un polimerosoma, un vector vírico y una micela.

FIG. 1A

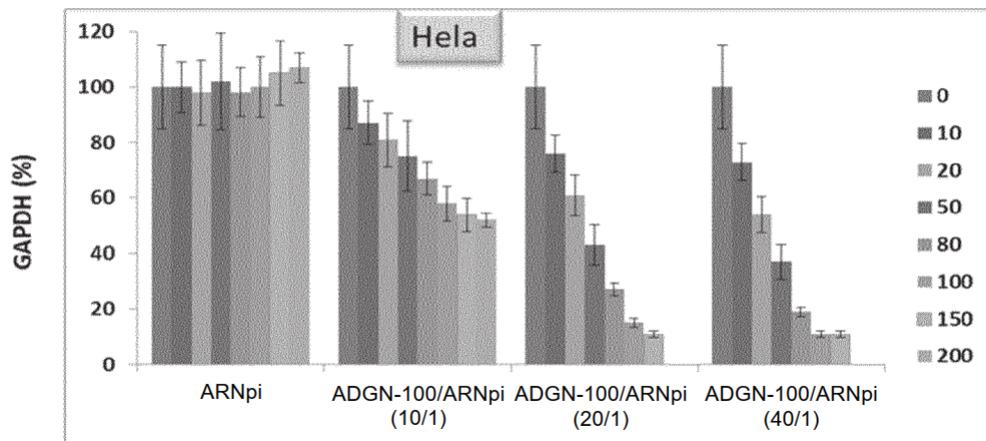


FIG. 1B

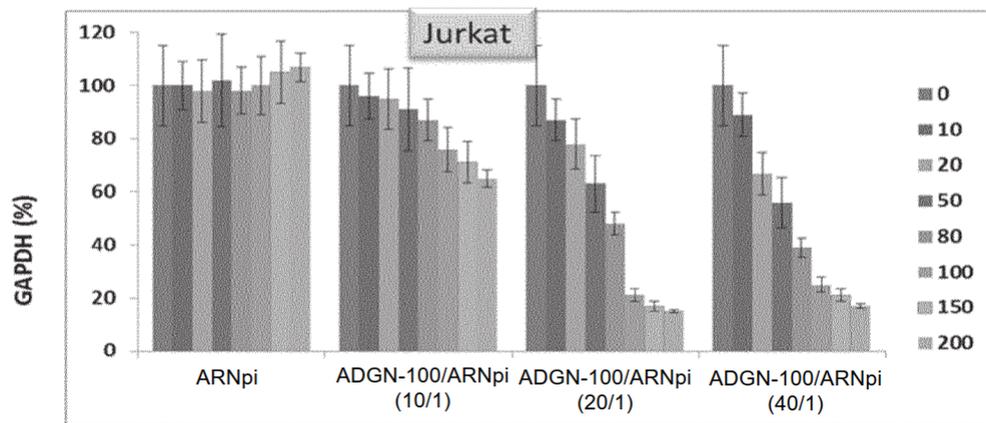


FIG. 2

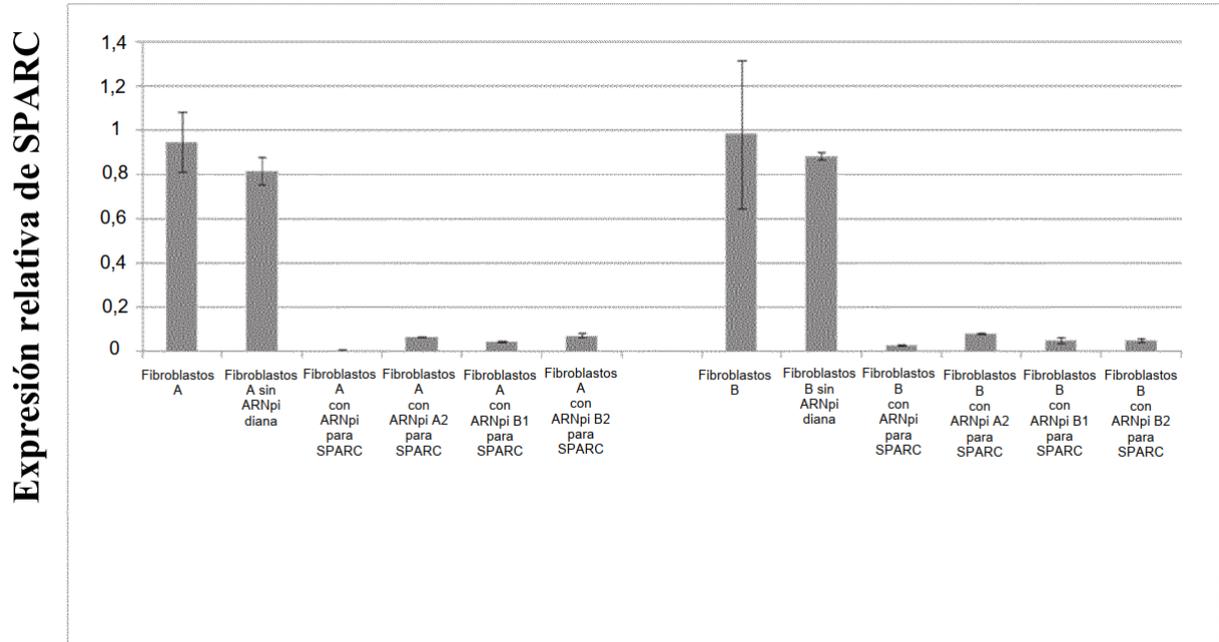


FIG. 3A

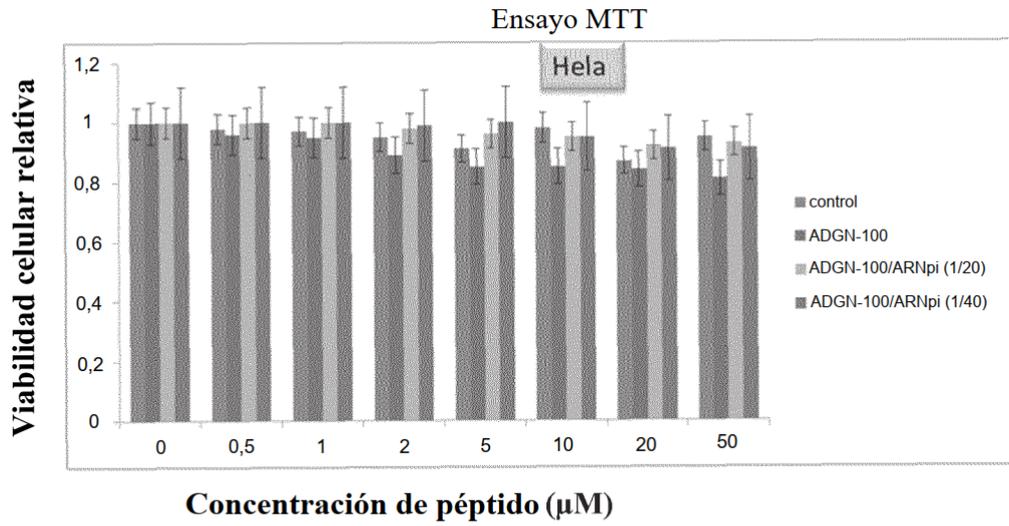


FIG. 3B

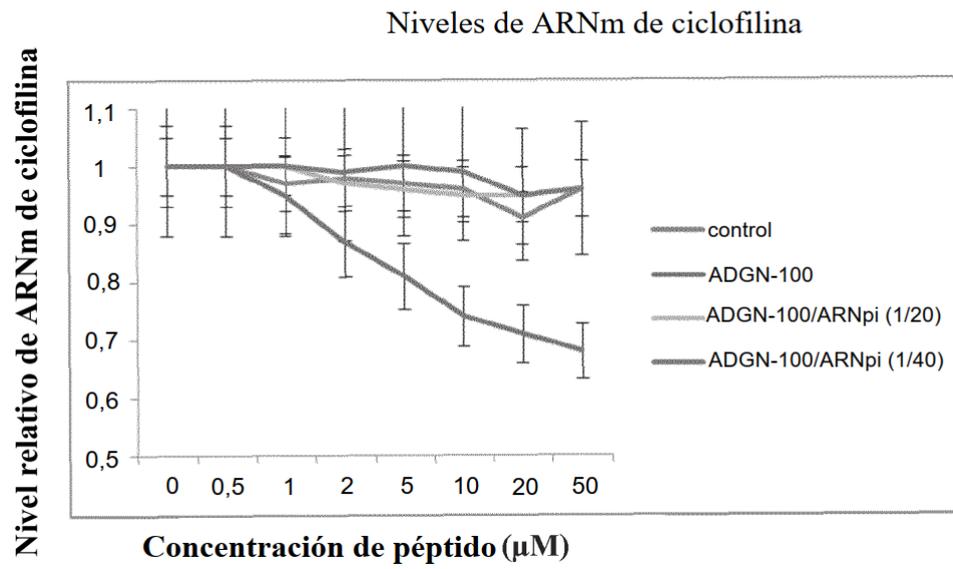


FIG. 4

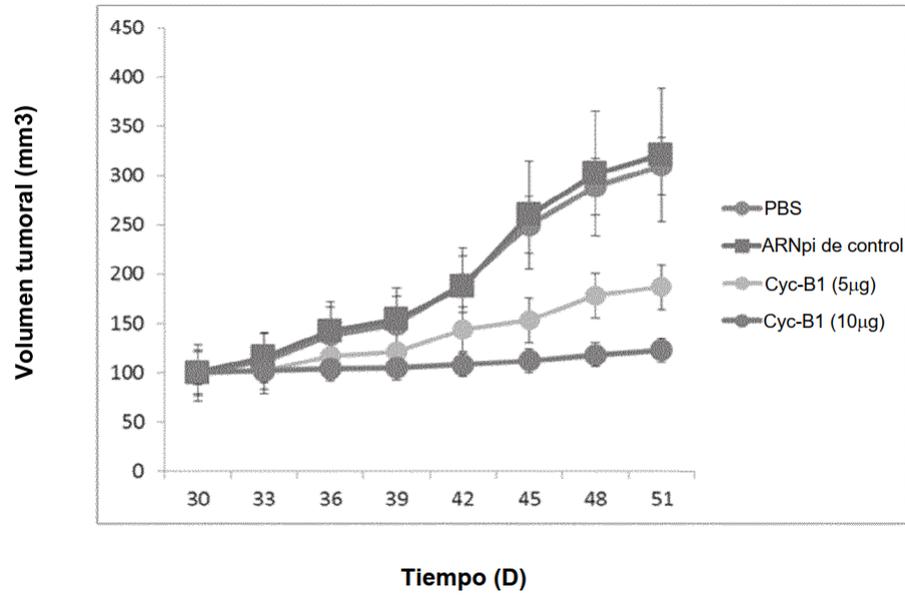


FIG. 5

- Modelos de tumores en ratón (5 animales/grupo): Células HT29 humanas
- Inyección IV cada tres días (0,5 mg/kg)
- Formulación: ADGN-100(ARNpi (relación 1/20), ciclina B1 o Cdc20 diana

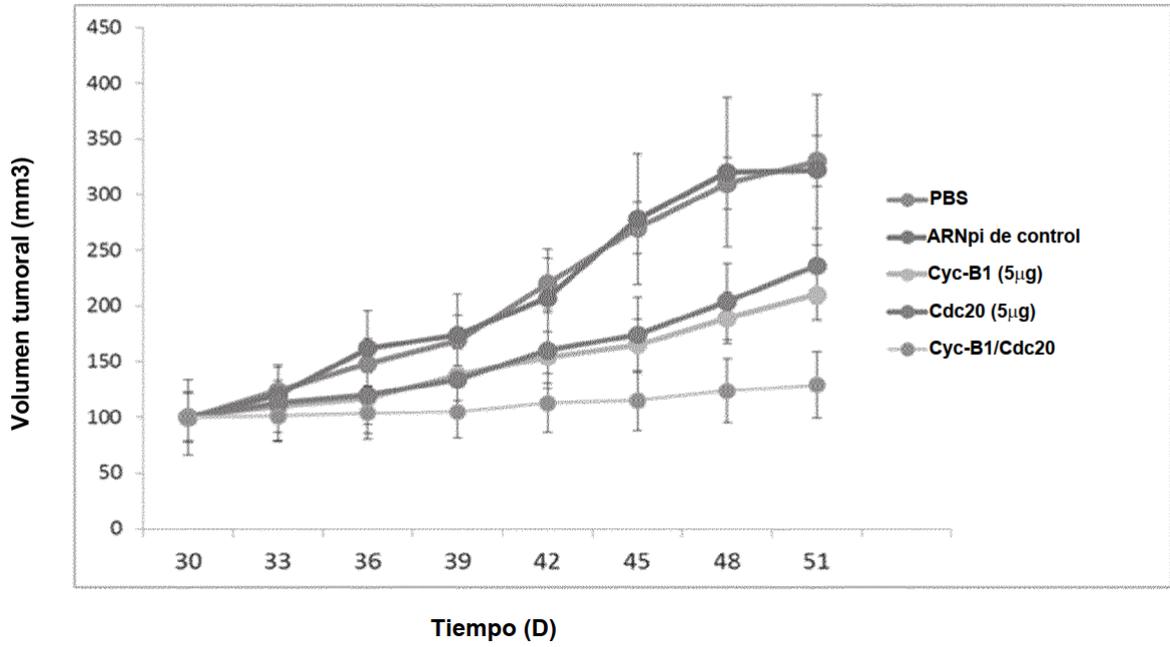


FIG. 6A

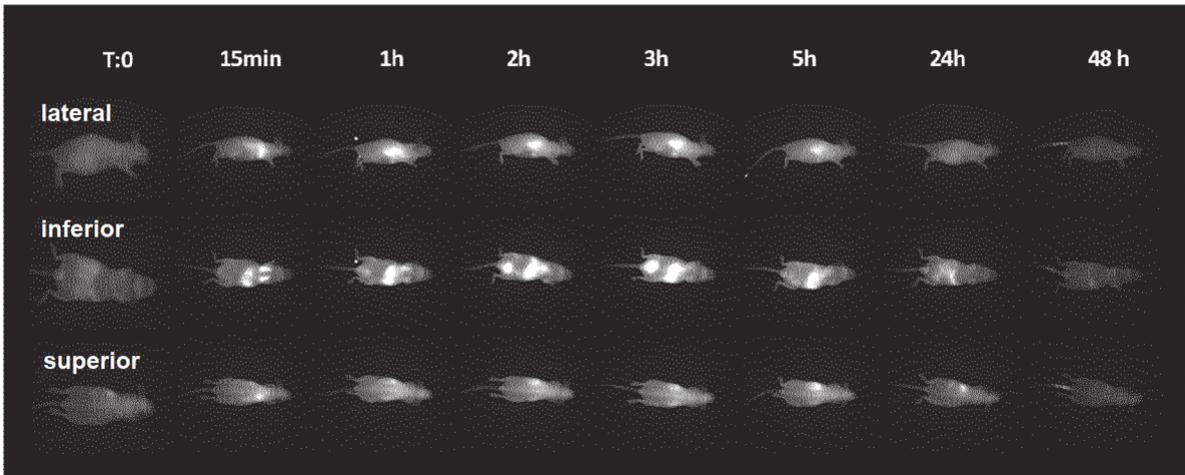


FIG. 6B

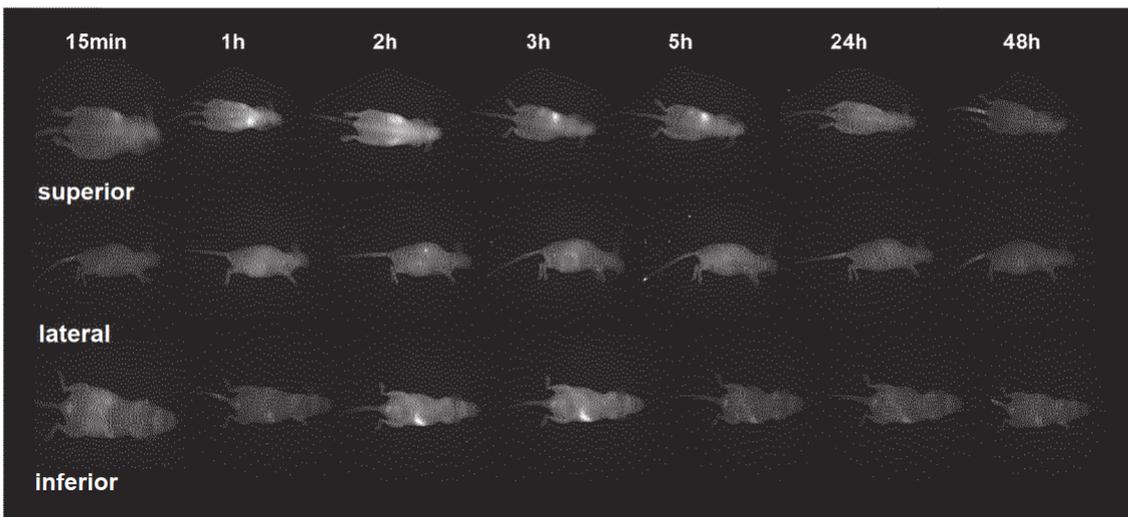


FIG. 7A

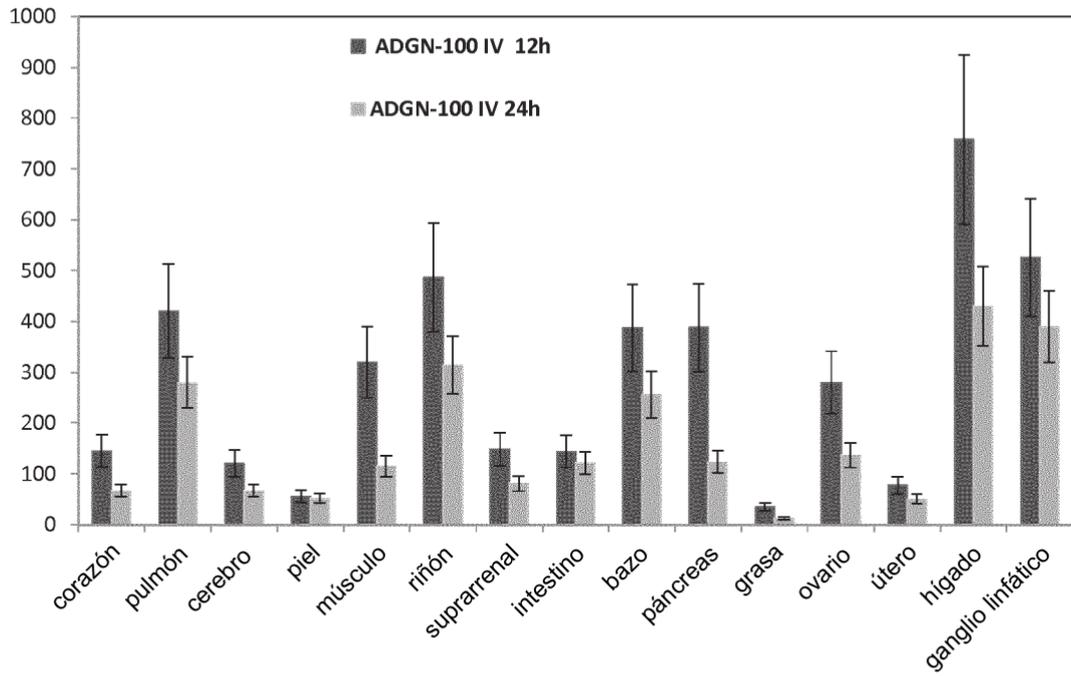


FIG. 7B

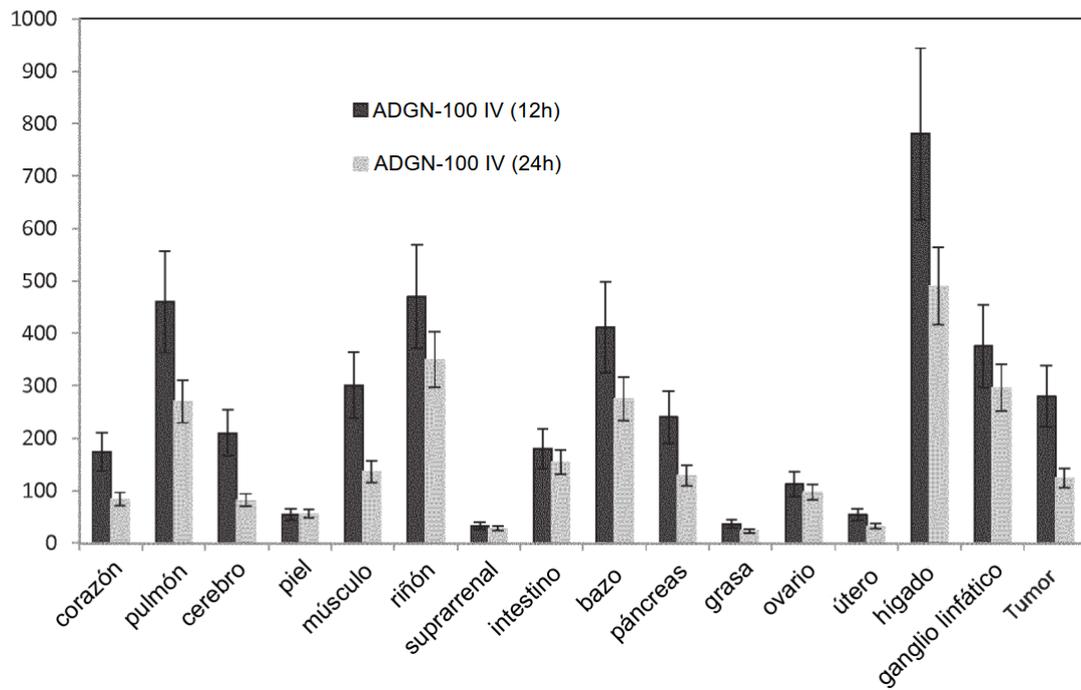


FIG. 7C

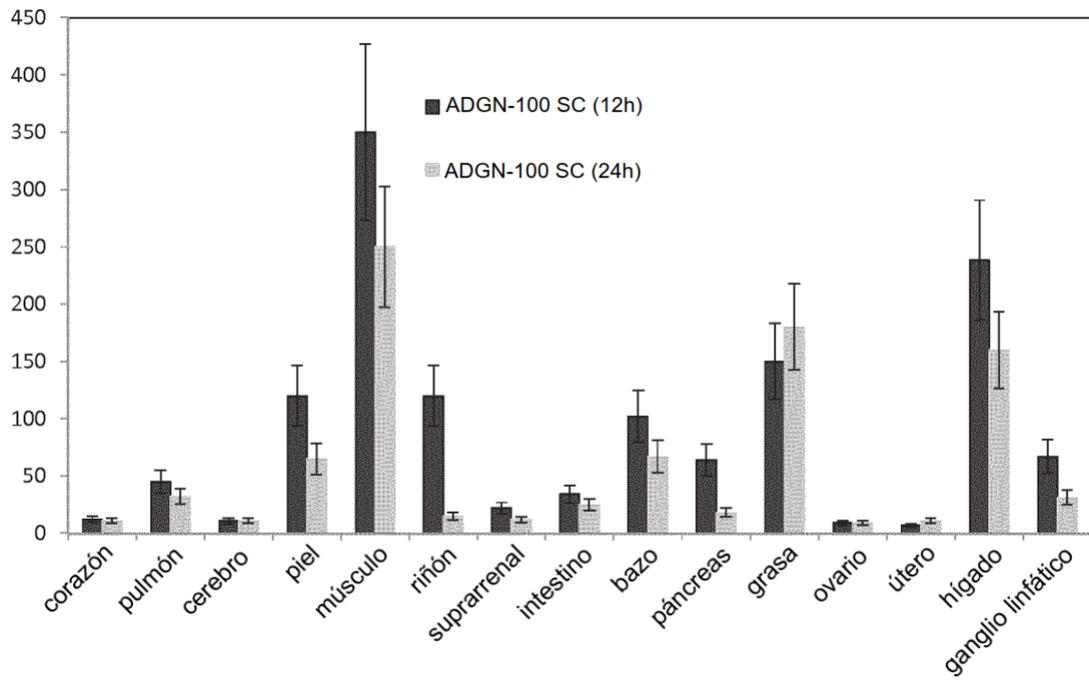


FIG. 8A

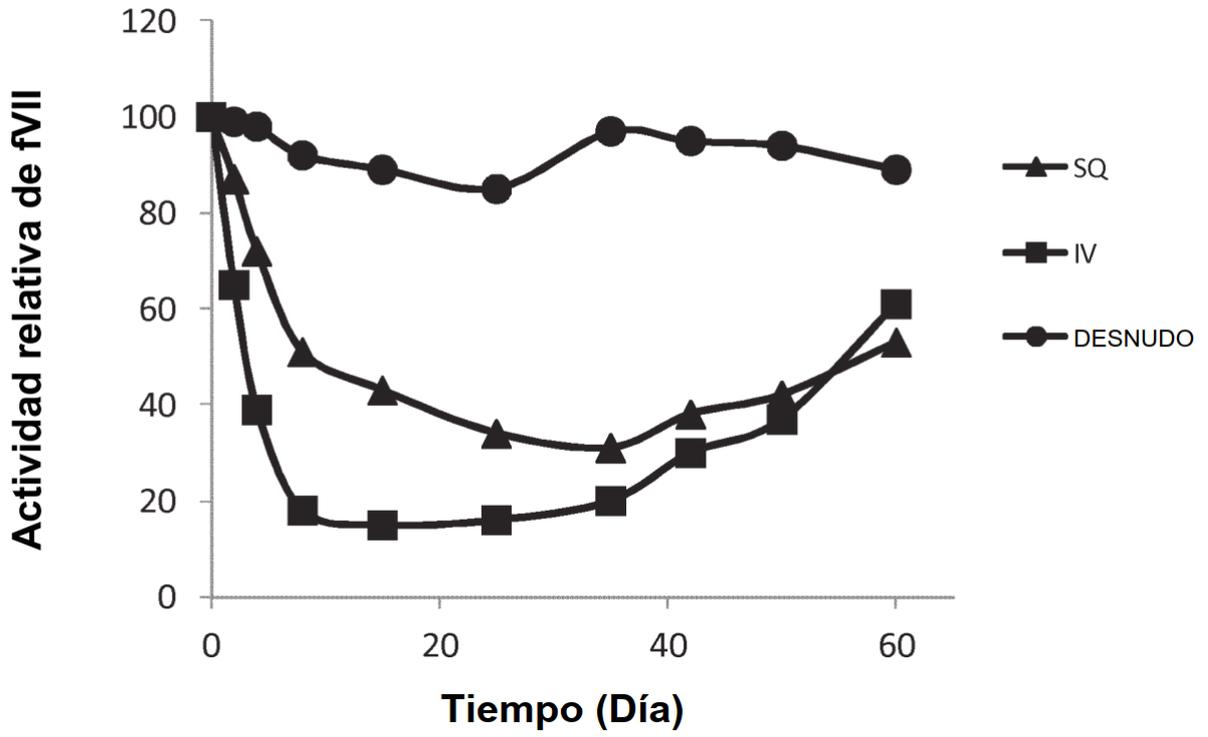


FIG. 8B

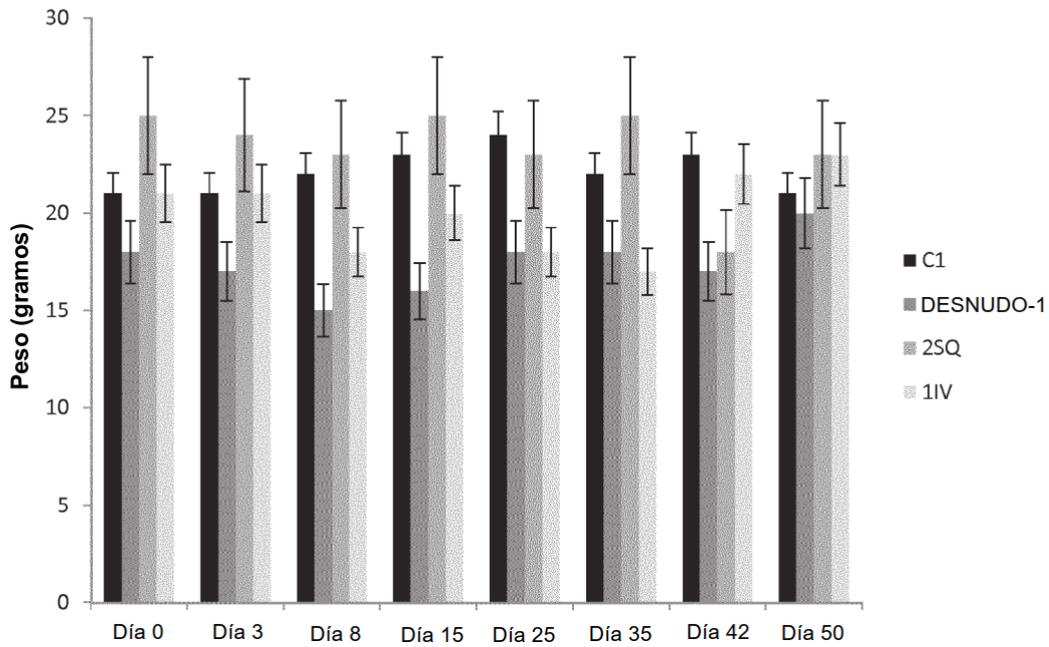


FIG. 9

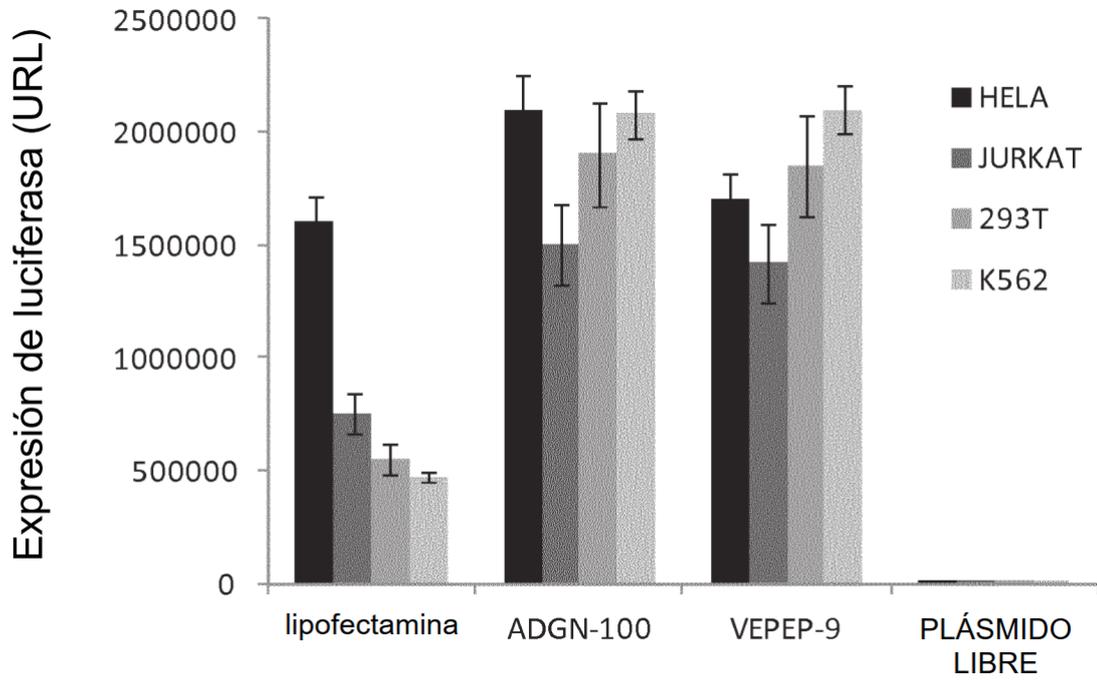


FIG. 10

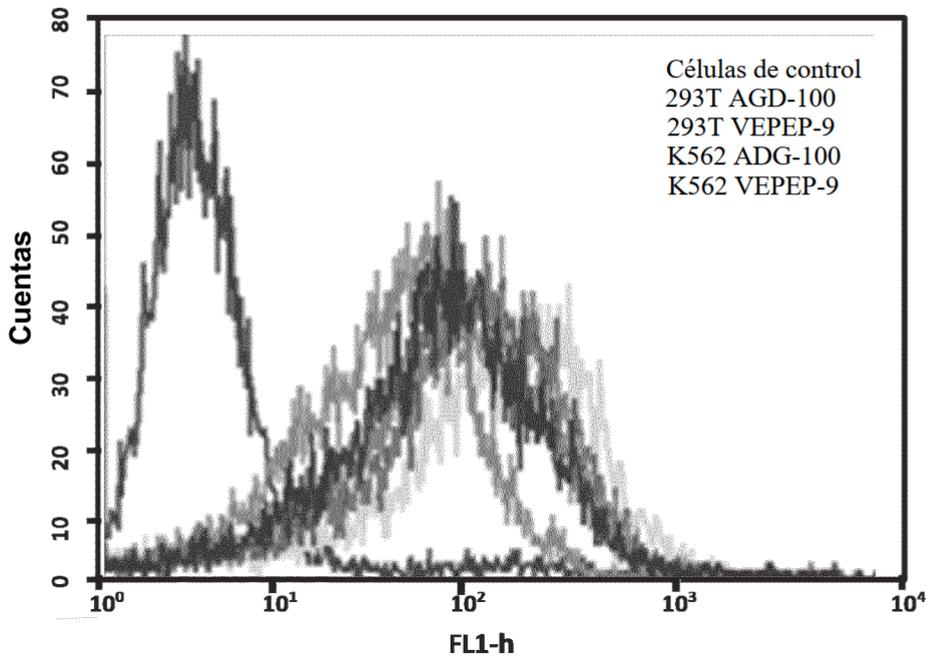


FIG. 11

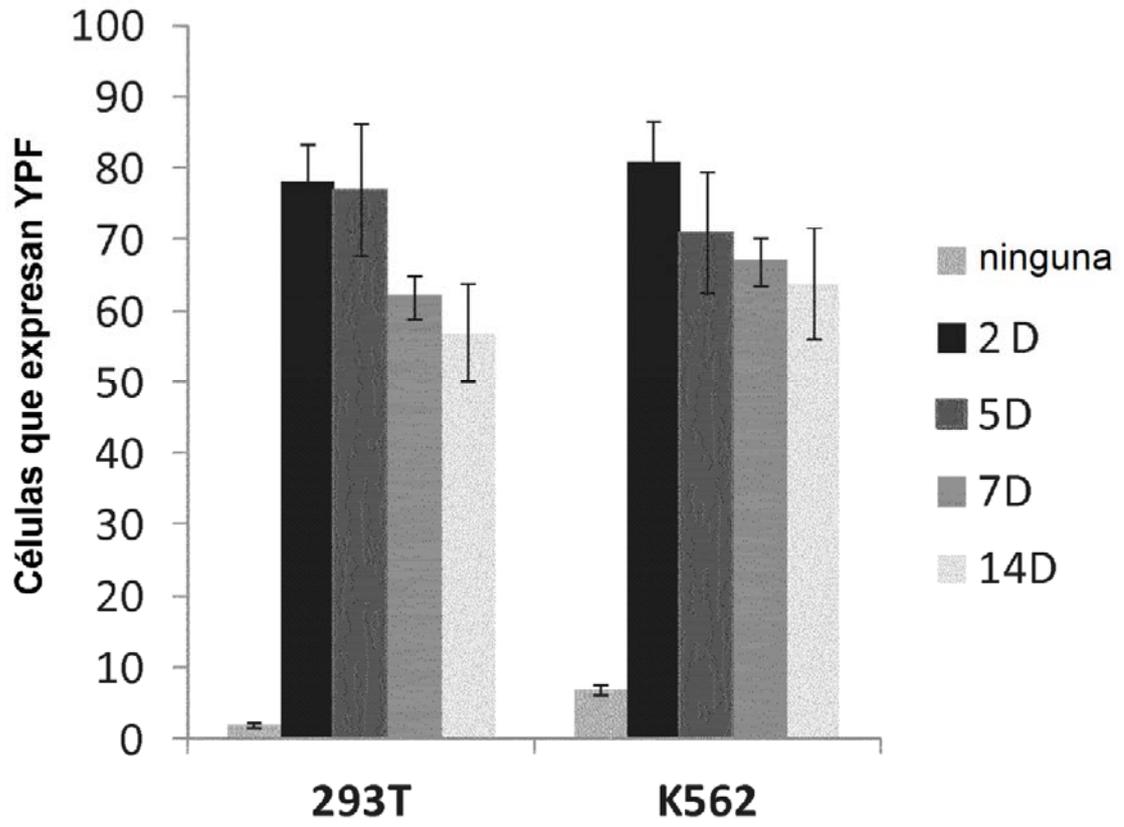


FIG. 12A

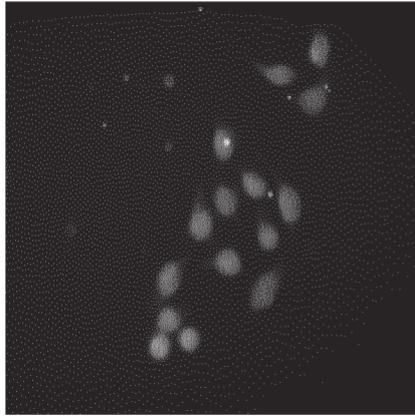


FIG. 12B

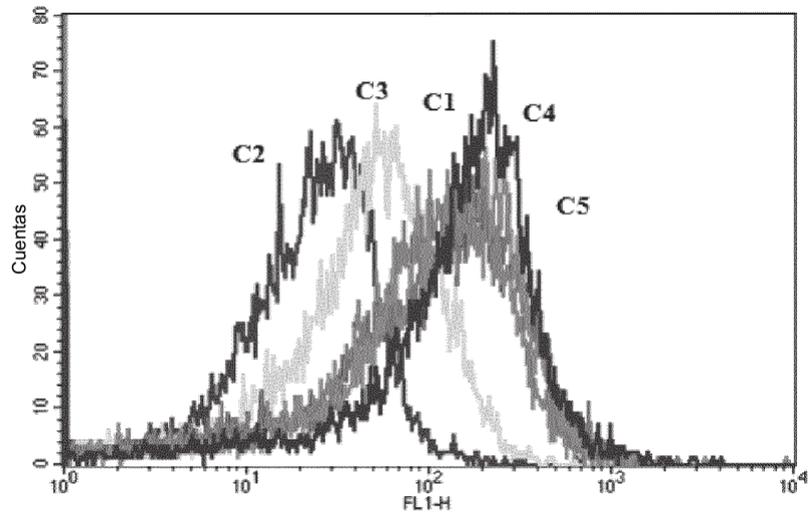


FIG. 13

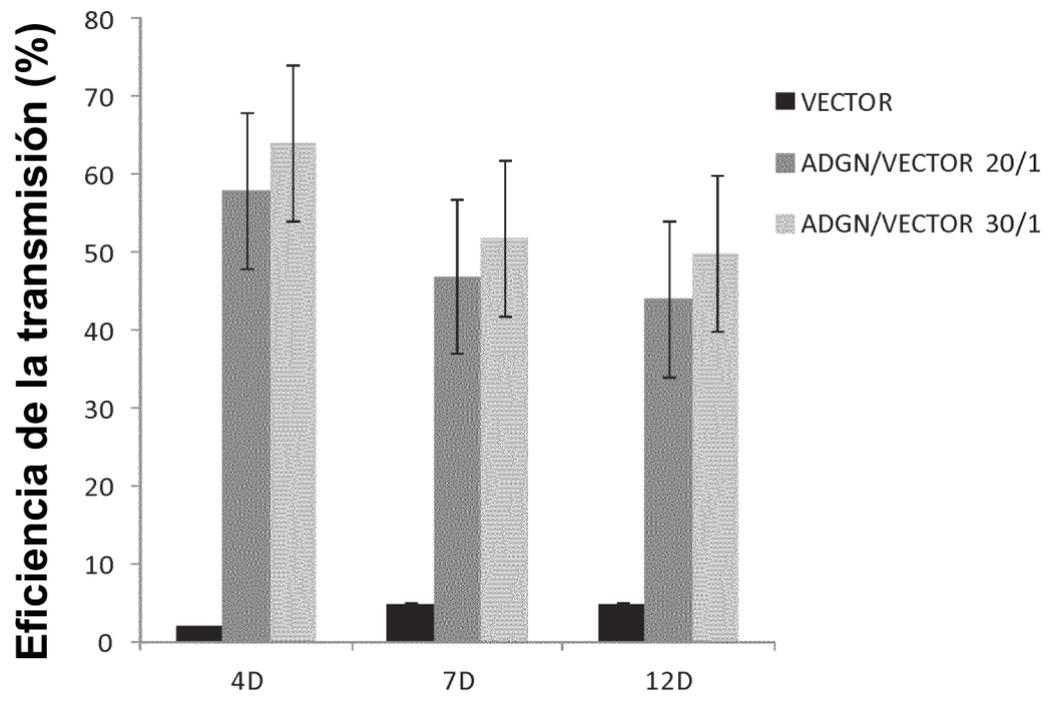


FIG. 14

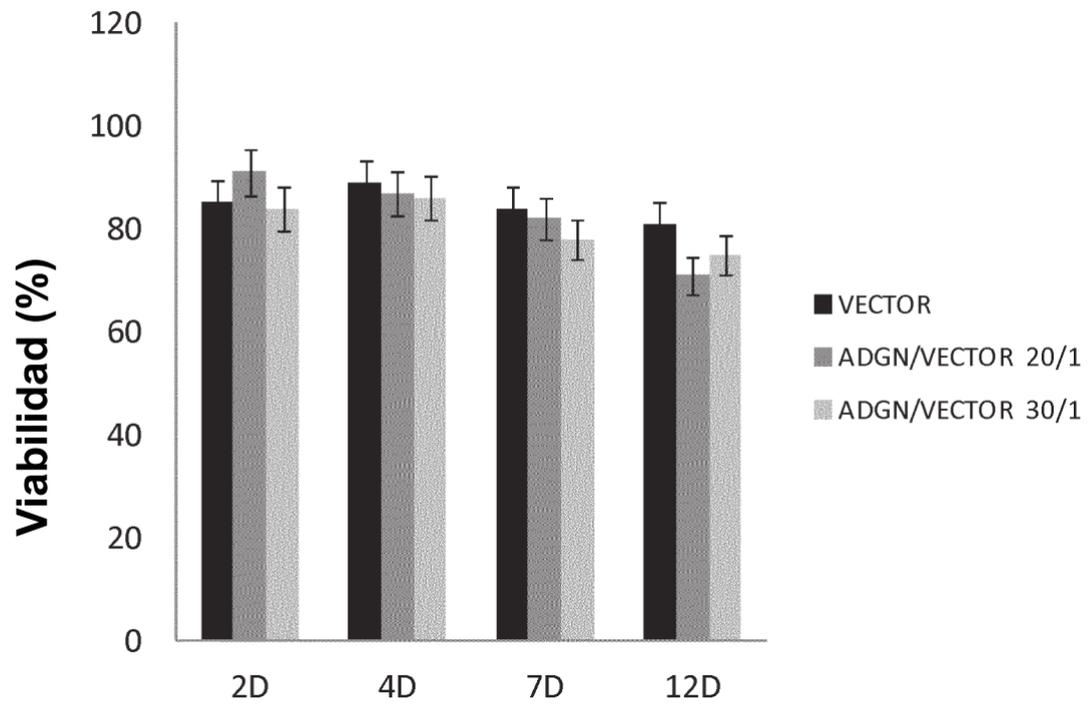


FIG. 15

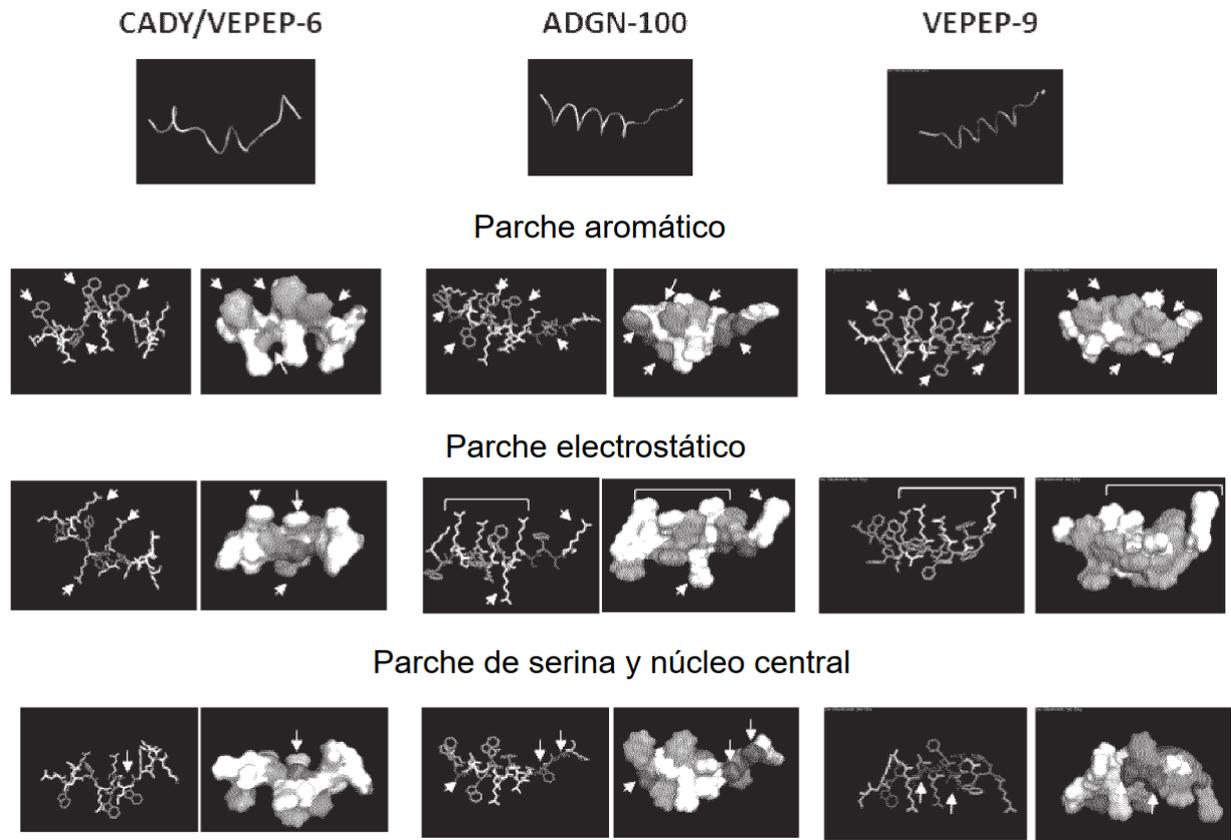


FIG. 16

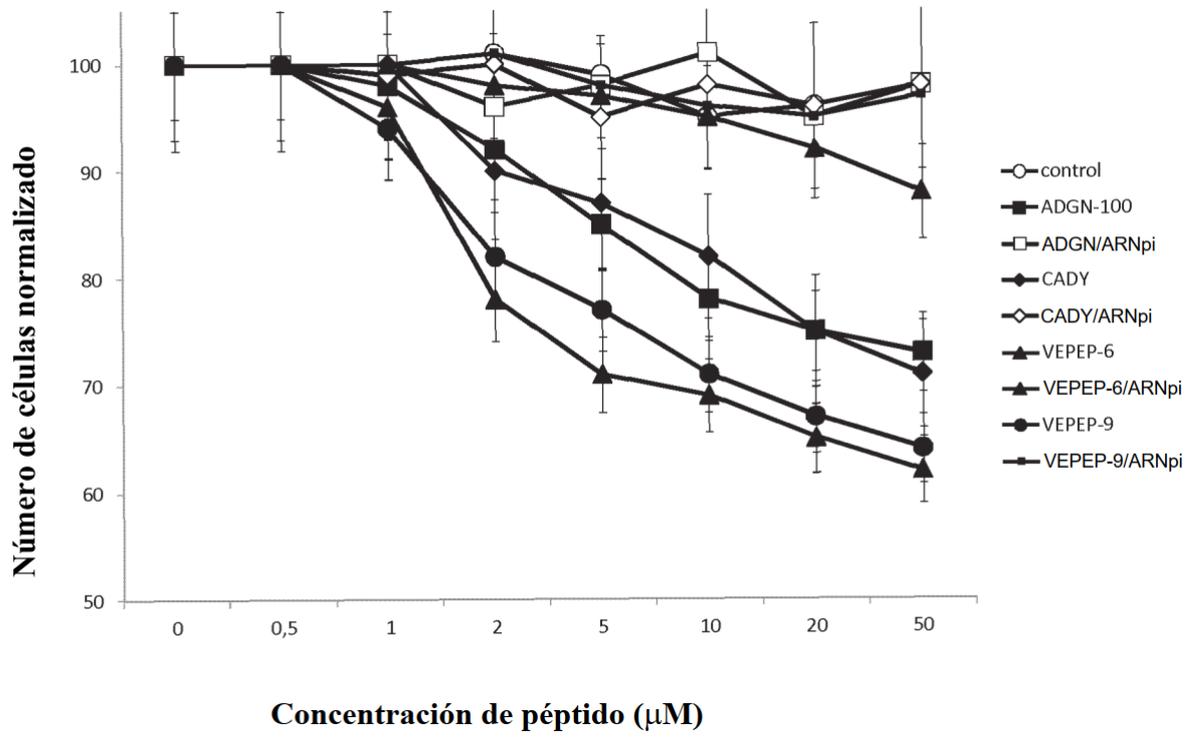


FIG. 17

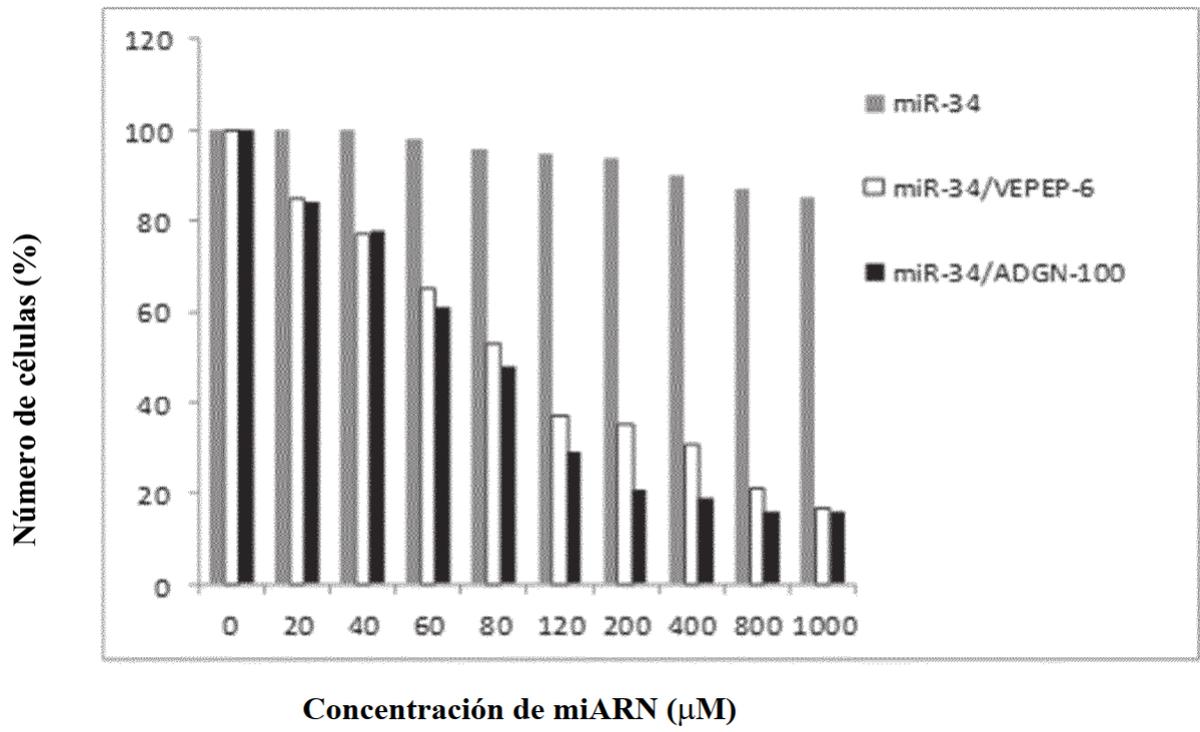


FIG. 18

