

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 866**

51 Int. Cl.:

A61K 47/54 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2014 PCT/US2014/070176**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15089487**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2014 E 14821440 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3079723**

54 Título: **Péptidos penetrantes de membrana para potenciar la transfección y composiciones y métodos para usar los mismos**

30 Prioridad:

12.12.2013 US 201361915429 P

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

02.03.2021

73 Titular/es:

**LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION (100.0%)
5823 Newton Drive
Carlsbad, CA 92008, US**

72 Inventor/es:

DE MOLLERAT DU JEU, XAVIER

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 808 866 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 penetrantes de membrana para potenciar la transfección y composiciones y métodos para usar los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención generalmente se refiere a los campos de transfección y cultivo celular. Particularmente, la invención proporciona péptidos que son adecuados para su uso como péptido penetrante de las células, complejos de transfección que contienen los péptidos y su uso para el suministro intracelular de carga.

10

Antecedentes

Se ha encontrado que los agregados lipídicos tales como los liposomas son útiles como agentes de suministro para introducir macromoléculas, tales como ADN, ARN, proteínas y pequeños compuestos químicos tales como moléculas pequeñas o moléculas farmacéuticamente activas, a células y tejidos en entornos de laboratorio y de investigación clínica. Particularmente, los agregados lipídicos que comprenden componentes lipídicos catiónicos han demostrado ser especialmente eficaces para suministrar moléculas aniónicas a las células. En parte, se cree que la eficacia de los lípidos catiónicos, y los complejos cargados positivamente formados con lípidos catiónicos resulta de una afinidad potenciada por las células, muchas de las cuales portan una carga negativa neta. También en parte, la carga positiva neta sobre los agregados lipídicos que comprenden un lípido catiónico permite que el agregado se una a los polianiones, tales como los ácidos nucleicos. Se conoce que los agregados lipídicos que contienen ADN y ARN son agentes eficaces para la transfección eficaz de células objetivo.

La estructura de diversos tipos de agregados lipídicos varía, dependiendo de la composición y el método para formar el agregado. Tales agregados incluyen liposomas, vesículas unilamelares, vesículas multilaminares, micelas y similares, que tienen tamaños particulares en el intervalo de nanómetros a micrómetros. Los métodos para preparar agregados lipídicos son generalmente conocidos en la técnica. El principal inconveniente del uso de liposomas que contienen fosfolípidos convencionales para el suministro es que la composición de liposomas tiene una carga negativa neta que no se atrae por la superficie celular cargada negativamente. Al combinar compuestos lipídicos catiónicos con un fosfolípido, las vesículas cargadas positivamente y otros tipos de agregados lipídicos pueden unir ácidos nucleicos, que están cargados negativamente, pueden ser absorbidos por las células objetivo y pueden transfectar las células objetivo. (Felgner, PL y otros (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7417; Eppstein, D. y otros, Patente de los Estados Unidos Núm. 4,897,355.).

Los métodos para incorporar lípidos catiónicos en agregados lipídicos se conocen bien en la técnica. Los métodos representativos se describen por Felgner y otros, *supra*; Eppstein y otros *supra*, Behr y otros, *supra* Bangham, A. y otros (1965) M. Mol. Biol. 23: 238 - 252; Olson, F. y otros (1979) Biochim. Biophys. Acta 557:9 -23; Szoka, F. y otros (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:4194-4198; Mayhew, E. y otros (1984) Biochim. Biophys. Acta 775:169-175; Kim, S. y otros (1983) Biochim. Biophys. Acta 728:339-348; y Fukunaga, M. y otros (1984) Endocrinol. 115:757-761. Las técnicas comúnmente usadas para preparar agregados lipídicos de tamaño apropiado para su uso como vehículos de suministro incluyen sonicación y congelación-descongelación más extrusión. Ver, *por ejemplo*, Mayer, L. y otros (1986) Biochim. Biophys. Acta 858:161-168. La microfluidización se usa cuando se desean agregados consistentemente pequeños (50 nm a 200 nm) y relativamente uniformes (Mayhew, E., *supra*). Los lípidos catiónicos también se han usado en el pasado para suministrar moléculas de ARN de interferencia (ARNi) a las células (Yu y otros (2002) PNAS 99: 6047 - 6052; Harborth y otros (2001) Journal of Cell Science 114:4557 - 4565).

El uso de lípidos catiónicos se ha vuelto cada vez más popular desde su introducción hace más de 15 años. Se han descrito varios lípidos catiónicos en la literatura y algunos de estos están disponibles en el comercio. DOTMA (cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio) fue el primer lípido catiónico que se sintetizó para el propósito de la transfección de ácido nucleico. Ver Felgner y otros. (Proc. Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987); Patente de los Estados Unidos Núm. 4.897.355). DOTMA se puede formular solo o se puede combinar con DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina) en un liposoma, y tales liposomas se pueden usar para suministrar plásmidos en algunas células. Otras clases de lípidos posteriormente se han sintetizado por diversos grupos. Por ejemplo, DOGS (5-carboxiespermidina dioctadecilamida) fue el primer lípido policationico que se preparó (Behr y otros. Proc. Nat'l Acad. Sci. 86, 6982 (1989); Patente de los Estados Unidos Núm. 5.171.678) y otros lípidos policationicos se han preparado desde entonces. El lípido DOSPA (2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio) se ha descrito como un agente de suministro eficaz (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.334.761).

En otros ejemplos, los lípidos catiónicos basados en colesterol, tales como DC-Chol (N,N-dimetil-N-etilcarboxamidocolesterol) se han preparado y usado para la transfección (Gao y otros. Biochem. Biophys. Res. Com. 179, 280 (1991)). En otro ejemplo, se preparó 1,4-bis(3-N-oleilamino-propil)piperazina y se combinó con histona H1 para generar un reactivo de suministro que se informó que era menos tóxico que otros reactivos (Wolf y otros. BioTechniques 23, 139 (1997); Patente de los Estados Unidos Núm. 5.744.335). Varios reactivos están disponibles en el comercio. Algunos ejemplos incluyen LIPOFECTIN® (DOTMA:DOPE) (Invitrogen, Carlsbad, California), LIPOFECTAMINE® (DOSPA:DOPE) (Invitrogen), LIPOFECTAMINE® 2000 (Invitrogen) FUGENE®, TRANSFECTAM® (DOGS), EFFECTENE® y DC-Chol.

65

Ninguno de estos reactivos puede usarse universalmente para todas las células. Quizás esto no sea sorprendente a la luz de la variación en la composición de las membranas de los diferentes tipos de células, así como las barreras que pueden restringir la entrada de material extracelular en las células. Además, el mecanismo por el cual los lípidos catiónicos suministran ácidos nucleicos a las células no se entiende claramente. Los reactivos son menos eficaces que los métodos de suministro viral y son tóxicos para las células, aunque el grado de toxicidad varía de un reactivo a otro.

Sin embargo, los agentes de transfección, que incluyen los lípidos catiónicos, no son universalmente eficaces en todos los tipos de células. La eficacia de la transfección de diferentes células depende de la composición particular del agente de transfección. Generalmente, los lípidos policatiónicos son más eficaces que los lípidos monocatiónicos en la transfección de células eucariotas. En muchos casos, los lípidos catiónicos por sí solos no son eficaces o solo son parcialmente eficaces para la transfección.

Si bien el uso de agregados lipídicos para introducir compuestos exógenos en las células (un proceso conocido en la técnica como "transfección") se ha convertido en un procedimiento de rutina en muchos laboratorios y se ha adaptado para su uso en una amplia variedad de tipos y linajes celulares, se estima que aproximadamente el 60 % de las células y las líneas celulares que usan habitualmente esta técnica en la investigación y entornos clínicos se consideran difíciles de transfectar, lo que significa que típicamente exhiben menos del 60 % de eficacia de la transfección. Las células definidas como difíciles de transfectar incluyen células primarias, tales como células madre, células progenitoras, células neuronales y otros tipos de células derivadas de tejidos neurales, células sanguíneas primarias ("PBMC"), HUVEC, y similares, así como ciertas líneas celulares que, si bien están establecidas, son difíciles de transfectar eficazmente mediante el uso de reactivos de transfección disponibles en el comercio. Los ejemplos de líneas celulares difíciles de transfectar incluyen PC12, HepG2, 3T3, LNCaP, A549, Jukat, y PC3, entre otros.

En las últimas décadas, una serie de péptidos de origen natural son capaces de promover la translocación de materiales en una célula al pasar a través de la membrana celular. Estos llamados "péptidos penetrantes de membrana" ("MPP") o "péptidos penetrantes de células" ("CPP") se han usado para promover el transporte de proteínas, ácidos nucleicos, polímeros, u otras moléculas funcionales en las células.

Péptidos penetrantes de membrana/células (CPP) tales como la penetratina derivada de antenapedia (Derossi y otros, *J. Biol. Chem.*, 269, 10444-10450, 1994) y el péptido Tat (Vives y otros, *J. Biol. Chem.*, 272, 16010-16017, 1997) se han usado para suministrar moléculas de carga tales como péptidos, proteínas y oligonucleótidos (Fischer y otros, *Bioconjug. Chem.*, 12: 825-841, 2001) en las células. Las áreas de aplicación varían desde investigación puramente celular hasta investigación biomédica (Dietz y Bahr, *Mol. Cell., Neurosci.*, 27, 85-131, 2004). Inicialmente, se creía que la absorción celular ocurría por la permeación directa de la membrana plasmática (Prochiantz, *Cuff. Opin. Cell Biol.*, 12, 400-406, 2000). En los últimos años, la evidencia se ha acumulado para indicar que al menos algunos CPP aumentan la absorción celular de carga al promover la endocitosis (para una revisión, ver FotinMleczek y otros, *Curr. Pharm. Design*, 11, 3613-3628, 2005). Dados estos resultados recientes, la especificación de un péptido como un CPP/MPP no implica necesariamente un mecanismo de importación celular específico, sino que se refiere a una función como un péptido que, cuando se asocia con una molécula de carga, ya sea covalente o no covalentemente, potencia la absorción celular de la molécula de carga.

Se han descrito diversos métodos para el suministro de carga en las células. El documento núm. WO 2013/138795 A1 describe un método para transportar moléculas a través de las membranas celulares mediante péptidos penetrantes de células cargadas positivamente (Surf+). El documento núm. WO 02/07773 A2 describe sistemas de transporte multicomponente con una cadena principal cargada positivamente para la administración de agentes terapéuticos. De Coupade y otros. (*Biochem. J.* 390, 407-418, 2005) describen péptidos Vectocell® para el suministro subcelular de biomoléculas terapéuticas. Los conjugados de péptidos penetrantes de células para suministrar ácidos nucleicos a una célula se describen en el documento núm. WO 2007/069068 A2. El documento núm. WO 02/072616 A2 describe complejos de transfección con péptidos que se unen a células epiteliales de las vías respiratorias humanas. El documento núm. WO 08/40502 A1 describe composiciones que comprenden un complejo de ácido nucleico con un péptido, en donde el péptido se acopla covalentemente a un grupo de unión a ácido nucleico y lípidos catiónicos o dendrímeros como agente de transfección.

Existe la necesidad de reactivos adicionales que potencien el suministro de carga y macromoléculas en las células al mejorar la eficacia de la transfección de todas las células, tanto en la investigación como en entornos clínicos, particularmente las células que se consideran "difíciles de transfectar" (es decir, aquellas células que son refractarias para la transfección o que exhiben una eficacia de la transfección sustancialmente menor que las líneas celulares transformadas estándar usadas habitualmente en entornos de laboratorio), pero son fáciles de usar y preparan y aprovechan la amplia gama de reactivos de transfección basados en lípidos catiónicos que están actualmente disponibles.

Breve descripción

La presente invención se expone en las reivindicaciones adjuntas y proporciona nuevos péptidos de origen no natural que tienen una función de penetración celular y son capaces de formar complejos de transfección con una molécula

de carga y uno o más lípidos catiónicos.

En la presente descripción se describen composiciones y métodos que proporcionan una eficacia mejorada para introducir macromoléculas, tales como ácidos nucleicos, en células en cultivo o en un tejido in vivo. Por consiguiente, ciertas modalidades proporcionan en la presente descripción un complejo que contiene, en asociación no covalente, una molécula de carga, tal como una molécula de ácido nucleico, un agente de transfección y un péptido de origen no natural, donde el péptido de origen no natural contiene una secuencia peptídica penetrante de membrana. En ciertos aspectos, los complejos contienen una macromolécula que se introduce en la célula, tal como un péptido, una proteína, o un ácido nucleico.

En un aspecto, los péptidos de origen no natural de la presente descripción tienen la estructura general:

A-L-B,

o

B-L-A;

Donde A es un péptido penetrante de membrana, L es ya sea un enlace o un péptido enlazador, y B es una porción catiónica o un polipéptido catiónico. En algunos ejemplos preferidos, aunque no limitantes, A es una secuencia peptídica seleccionada de las expuestas en la Tabla 1, o una variante de esta que retiene al menos una parte de su capacidad para potenciar la eficacia de la transfección. En algunos ejemplos, la secuencia peptídica de A está entre 5 a aproximadamente 50 aminoácidos, y A se caracteriza porque mejora el suministro de una molécula en una célula en al menos 50 % o más.

En algunos ejemplos, la secuencia peptídica de A está entre 5 a aproximadamente 50 aminoácidos, y A se caracteriza porque mejora el suministro de una molécula en una célula en 75 % o más.

En algunos ejemplos, A es al menos 75 % idéntico a cualquiera de los péptidos establecidos en la Tabla 1, o una variante de este que retiene al menos una parte de su capacidad para potenciar la eficacia de la transfección, donde A se caracteriza porque mejora el suministro de una molécula en una célula en al menos 10 % o más. En algunos ejemplos, A se selecciona de la lista que consiste en cualquiera de la SEQ ID NO. 1 a través de SEQ ID NO. 68, o una variante de esta.

En un aspecto de la invención, el péptido de origen no natural se selecciona de los péptidos con SEQ ID NO.:89-99 y 103 expuestos en la Tabla 4.

Otras modalidades de la presente descripción se dirigen a complejos de transfección que contienen los péptidos de origen no natural descritos anteriormente en combinación con uno o más reactivos de transfección, los cuales pueden incluir uno o más lípidos catiónicos, y opcionalmente uno o más lípidos auxiliares y/o neutros.

En algunos ejemplos, un complejo de transfección puede incluir una carga que se suministra al interior de una célula, u opcionalmente puede administrarse a un animal o a un paciente humano que se beneficiaría de la administración de este. En algunas modalidades ilustrativas, aunque no limitantes, las moléculas de carga preferidas adecuadas para su uso con la presente invención incluyen moléculas de ácido nucleico tales como moléculas de ADN o moléculas de ARN. Las moléculas de ADN adecuadas pueden incluir una molécula de ADN que tiene una secuencia de ácido nucleico expresable, tal como un vector de expresión o una molécula de ADNc que comprende un marco de lectura abierto que codifica una proteína. Otras moléculas adecuadas que pueden funcionar como carga adecuada en la práctica de la presente invención incluyen moléculas de ARN, tales como una molécula de ARNm o una molécula de ARNi.

Otras modalidades de la presente descripción se dirigen a métodos para preparar complejos de transfección y a métodos para el uso para suministrar una molécula de carga al interior de una célula. Los métodos para preparar un complejo de transfección pueden incluir poner en contacto una molécula de carga con al menos un lípido catiónico o reactivo de transfección y los péptidos de origen no natural de la presente invención, opcionalmente en presencia de uno o más lípidos auxiliares y/o uno o más lípidos neutros, bajo condiciones que promueven la formación de un complejo de transfección capaz de transportar la carga al interior de una célula.

Otras modalidades de la presente descripción se dirigen a métodos para transfectar células que incluyen formar complejos de transfección que comprenden al menos una molécula de carga, al menos un lípido catiónico o reactivo de transfección, y péptidos de origen no natural de acuerdo con la presente descripción, que opcionalmente tiene uno o más lípidos auxiliares y/o uno o más lípidos neutros, y contactar el complejo de transfección con una célula bajo condiciones que promueven la transfección de la célula. Aún otras modalidades de la presente descripción se dirigen a preparaciones farmacéuticas que comprenden una carga o un fármaco que se suministra a un animal o un sujeto humano, al menos lípido catiónico o reactivo de transfección y un péptido de origen no natural de la presente descripción, opcionalmente en la presencia de uno o más lípidos auxiliares y/o uno o más lípidos neutros, para formar

un complejo farmacéuticamente activo adecuado para el suministro de un fármaco o compuesto biológicamente activo a un animal o un sujeto humano que lo necesite para el tratamiento de una afección o trastorno fisiológico.

5 Otras modalidades de la presente descripción serán evidentes para un experto en la técnica a la luz de los siguientes dibujos y la descripción de la descripción.

Breve descripción de los dibujos

10 Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención como referencia a la siguiente descripción detallada que expone las modalidades ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos acompañantes en los que:

15 La Figura 1A muestra un panel de 10 líneas celulares de cáncer diferentes que expresan la proteína fluorescente verde (GFP) que se transfectaron con un vector de expresión que codifica GFP mediante el uso de LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con un péptido de acuerdo con una modalidad;

20 La Figura 1B muestra 2 líneas celulares neuronales diferentes que expresan GFP que se transfectaron con un vector de expresión que codifica GFP mediante el uso de LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con un péptido de acuerdo con una modalidad;

25 La Figura 1C muestra 2 líneas celulares de mioblastos diferentes que expresan GFP que se transfectaron con un vector de expresión que codifica GFP mediante el uso de LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con un péptido de acuerdo con una modalidad;

La Figura 1D muestra una línea celular de fibroblastos de riñón que expresa GFP que se transfectaron con un vector de expresión que codifica GFP mediante el uso de LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con un péptido de acuerdo con una modalidad;

30 La Figura 2 muestra un panel de seis líneas celulares diferentes que expresan GFP que se transfectaron con un vector de expresión que codifica GFP mediante el uso del reactivo de transfección disponible en el comercio indicado; FUGENE® HD (primera columna), LIPOFECTAMINE® 2000 (columna central); y LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con un péptido de acuerdo con una modalidad (última columna);

35 La Figura 3A es un gráfico que compara la eficacia de la transfección relativa de un vector de expresión que codifica GFP transfectado en células HeLa cultivadas mediante el uso de dosis crecientes de tres formulaciones de agregados lipídicos diferentes disponibles en el comercio, LIPOFECTAMINE® 2000 (círculos abiertos), LIPOFECTAMINE® LTX (cuadrados abiertos), y LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con un péptido de acuerdo con una modalidad (triángulos abiertos);

40 La Figura 3B es un gráfico que compara la intensidad de la expresión de GFP en células HeLa transfectadas con un vector de expresión que codifica GFP mediante el uso de dosis creciente de tres formulaciones de agregados lipídicos disponibles en el comercio, LIPO-FECTAMINE® 2000 (círculos abiertos), LIPOFECTAMINE® LTX (cuadrados abiertos), y LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con un péptido de acuerdo con una modalidad (triángulos abiertos);

45 La Figura 4 es una membrana de Western que compara los niveles de expresión relativos de una proteína de fusión GST-STAT (panel superior) en células HepG2 transfectadas con un vector de expresión que codifica una proteína de fusión GST-STAT mediante el uso de las siguientes formulaciones de agregados lipídicos disponibles en el comercio: LIPOFECTAMINE® 2000 (primer carril), LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con un péptido de acuerdo con una modalidad (segundo carril), FUGENE® HD (tercer carril), y X-TREM-EGENE™ HP (último carril). El panel inferior muestra una membrana de western de β -actina endógena para confirmar la carga igual de extracto citosólico en cada carril;

50 La Figura 5A es un gráfico que compara la eficacia de la transfección relativa de la línea de células madre embrionarias humanas H9 (37.500 células por pocillo de una placa de 96 pocillos) transfectada con una dosis creciente de un vector de expresión de GFP (50 μ g, panel izquierdo; 100 μ g panel central y 200 μ g panel derecho) y mediante el uso entre 0,1 a 0,6 μ l por pocillo de LIPOFECTAMINE® 2000 (triángulos abiertos) o LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con un péptido de acuerdo con una modalidad;

55 La Figura 5B es una imagen de fluorescencia representativa de la expresión de GFP en células H9 cultivadas en placas de 96 pocillos transfectadas con 100 μ g/pocillo mediante el uso de 200 μ l de LIPOFECTAMINE® 2000 (panel izquierdo, que demuestra una eficacia de la transfección del 18 % de las células H9) o LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con un péptido de acuerdo con una modalidad (panel derecho);

60 La Figura 6A muestra la eficacia de la modificación genómica de las células U2OS mediante el uso de un sistema

disponible en el comercio, medido por la intensidad media de la proteína fluorescente naranja (OFP) (gráfico de barras, panel superior) y las imágenes de fluorescencia representativas (panel inferior) de la expresión de OFP en células U2OS modificadas mediante el uso de lo indicado aproximadamente de LIPOFECTAMINE® 2000 o LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con un péptido de acuerdo con una modalidad;

5 La Figura 6B muestra la eficacia de la modificación genómica de las células HepG2 mediante el uso de un sistema disponible en el comercio medido por la intensidad media de OFP (gráfico de barras, panel superior) e imágenes representativas de fluorescencia (panel inferior) de la expresión de OFP en células HepG2 modificadas mediante el uso de lo indicado aproximadamente de LIPOFECTAMINE® 2000 o LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con un péptido de acuerdo con una modalidad;

10 La Figura 7A muestra la eficacia de la escisión para las TALEN y CRISPR dirigidos al locus AAVS1 en las células U2OS mediante el uso de LIPOFECTAMINE® 2000 o LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con un péptido de acuerdo con una modalidad;

15 La Figura 7B muestra la eficacia de escisión para las TALEN y CRISPR dirigidos al locus AAVS1 en células HepG2 mediante el uso de LIPOFECTAMINE® 2000 o LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con un péptido de acuerdo con una modalidad;

20 La Figura 8 son gráficos de barras que representan la eficacia de la transfección relativa (gráfico superior, GFP+ como % de células individuales solamente) o nivel de expresión relativa por célula (gráfico inferior; solo células individuales significan FL-1) de células HeLa transfectadas con un vector de expresión GFP mediante el uso de la dosis indicada (en µl) de LIPOFECTAMINE® 3000 solo (LF3K), LIPOFECTAMINE® 2000 (LF2K), un péptido de acuerdo con una modalidad (Péptido 1) o LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con un péptido de acuerdo con una modalidad (LF3K+ Péptido 1);

25 La Figura 9A es una representación de un mapa peptídico de diversos péptidos o fragmentos de péptidos usados en los experimentos representados en la Figura 9B y 9C en células HepG2, en el que el péptido A es el péptido MPP solo, el péptido B es el péptido enlazador solo, el péptido C es el péptido catiónico solo, el péptido D es el péptido enlazador fusionado con el péptido catiónico, y el péptido E es un péptido de longitud completa que tiene el péptido D fusionado con el péptido A;

30 La Figura 9B representa una serie de imágenes de fluorescencia para detectar la expresión de GFP en células HepG2 cultivadas transfectadas con un vector de expresión que codifica GFP mediante el uso de LIPOFECTAMINE® 3000 en presencia del péptido o combinación de péptidos indicados (se muestra en la Figura 9A);

35 La Figura 9C representa dos gráficos de barras que muestran la fluorescencia media por célula (gráfico superior) y la eficacia de la transfección (GFP % + células) en células HepG2 transfectadas con un vector de expresión que codifica GFP mediante el uso de LIPOFECTAMINE® 3000 en presencia de uno de los péptidos A - E indicados o la combinación indicada de péptidos (se muestra en la Figura 9A);

40 La Figura 10A es una representación de un mapa peptídico de diversos péptidos o fragmentos de péptidos usados en los experimentos representados en la Figura 10B y 10C en células A549, en el que el péptido A es el péptido MPP solo, el péptido B es el péptido enlazador solo, el péptido C es el péptido catiónico solo, el péptido D es el péptido enlazador fusionado con el péptido catiónico, y el péptido E es un péptido de longitud completa que tiene el péptido D fusionado con el péptido A;

45 La Figura 10B representa una serie de imágenes de fluorescencia para detectar la expresión de GFP en células A549 cultivadas transfectadas con un vector de expresión que codifica GFP transfectado con LIPOFECTAMINE® 3000 en presencia del péptido indicado o combinación de péptidos (se muestra en la Figura 10A);

50 La Figura 10C representa dos gráficos de barras que muestran la fluorescencia media por célula (gráfico superior) y la eficacia de la transfección (GFP % + células) en células A549 transfectadas con un vector de expresión que codifica GFP mediante el uso de LIPOFECTAMINE® 3000 en presencia de uno de los péptidos A - E indicados o la combinación indicada de péptidos (se muestra en la Figura 10A);

55 La Figura 11A es una representación de un mapa peptídico de diversos péptidos o fragmentos de péptidos usados en los experimentos representados en la Figura 11B y 11C en células MDA-MB-231, en las que el péptido A es el péptido MPP solo, el péptido B es el péptido enlazador solo, el péptido C es el péptido catiónico solo, el péptido D es el péptido enlazador unido al péptido catiónico, y el péptido E es un péptido de longitud completa que tiene el péptido A fusionado con el péptido D;

60 La Figura 11B representa una serie de imágenes de fluorescencia para detectar la expresión de GFP en células MDA-MB-231 cultivadas transfectadas con un vector de expresión que codifica GFP transfectado con LIPOFECTAMINE® 3000 en presencia del péptido o combinación de péptidos indicados (se muestra en la Figura

11A);

La Figura 11C representa dos gráficos de barras que muestran la fluorescencia media por célula (gráfico superior) y la eficacia de la transfección (GFP % + células) en células MDA-MB-231 transfectadas con un vector de expresión que codifica GFP mediante el uso de LIPOFECTAMINE® 3000 en presencia de uno de los péptidos indicados A - E o la combinación indicada de péptidos (se muestra en la Figura 11A);

Descripción detallada

La presente descripción proporciona reactivos y composiciones mejorados que son adecuados para la transfección de células. Particularmente, la presente descripción proporciona composiciones y reactivos que potencian la eficacia de la transfección de todas las células, que incluyen aquellos tipos de células que se consideran típicamente difíciles de transfectar. Las composiciones y reactivos de la presente descripción, cuando se usan de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción, así como con el conocimiento general y la experiencia dentro del ámbito de alguien con un nivel de habilidad ordinario en la técnica, pueden aumentar típicamente la eficacia de la transfección de los mismos hasta 25 %, hasta 30 %, hasta 35 %, hasta 40 %, hasta 45 %, hasta 50 %, hasta 55 %, hasta 60 %, hasta 65 %, hasta 70 %, hasta 75 %, hasta 80 %, hasta 85 %, hasta 90 %, hasta 95 %, hasta 100 % o más del 100 %. La descripción logra esto proporcionando péptidos novedosos que comprenden una secuencia peptídica que penetra en célula/membrana usada en combinación con uno o más lípidos de transfección como se describe con mayor detalle a continuación.

Definiciones

Los términos usados a lo largo de esta especificación generalmente tienen sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de la invención, y en el contexto específico donde se usa cada término. Algunos términos se discuten a continuación, o en otra parte de la especificación, para proporcionar orientación adicional al profesional en la descripción de las diversas modalidades de la invención y cómo hacerlas y usarlas. Se apreciará que el mismo concepto puede expresarse en más de una forma. En consecuencia, se puede usar un lenguaje alternativo y sinónimos para uno o más de los términos discutidos en la presente descripción, ni se debe dar ninguna importancia especial a si un término se elabora o analiza en mayor detalle en la presente descripción. Se pueden proporcionar sinónimos para ciertos términos. Un recital de uno o más sinónimos no excluye el uso de otros sinónimos. El uso de ejemplos en cualquier parte de esta especificación, que incluyen ejemplos de cualquiera de los términos discutidos en la presente descripción, es solo ilustrativo, y de ninguna manera limita el alcance y el significado de la descripción o de cualquier término ejemplificado.

El término "introducción" cuando se usa en el contexto de introducir una macromolécula en cultivo celular se refiere a la provisión de la macromolécula o compuesto en el medio de cultivo con el entendimiento de que el objetivo de introducir la macromolécula es permitir la transferencia de macromolécula desde el compartimento extracelular al compartimento citoplasmático de la célula cultivada.

El término "introducción" de una macromolécula o compuesto en al menos una célula se refiere a la provisión de una macromolécula o compuesto a una célula, de manera que la macromolécula o compuesto se internaliza en la célula. Por ejemplo, una macromolécula o compuesto puede introducirse en una célula mediante el uso de transfección, transformación, inyección, y/o introducción de liposomas, y también puede introducirse en una célula mediante el uso de otros métodos conocidos por los expertos en la técnica. Preferentemente, una macromolécula o compuesto se introduce en una célula mediante introducción liposómica. La macromolécula es preferentemente una proteína, péptido, polipéptido, o ácido nucleico. La macromolécula puede ser una proteína. Alternativamente, la macromolécula puede ser un péptido. Alternativamente, la macromolécula puede ser un polipéptido. La macromolécula también puede ser un ácido nucleico.

El término "carga", cuando se usa en la presente descripción en el contexto del suministro de una carga al interior de una célula, tal como por medio de transfección, generalmente se refiere a cualquier sustancia que se transportará al interior de una célula, ya sea en cultivo en un laboratorio o en un tejido en un animal o un humano. Una carga puede, dependiendo de la aplicación, ser una macromolécula tal como un ácido nucleico, una proteína, o un péptido, o puede ser un fármaco u otra molécula pequeña orgánica.

El término "macromolécula", como se usa en la presente descripción, abarca biomoléculas. En una modalidad, el término macromolécula se refiere a ácido nucleico. En una modalidad preferida, el término macromolécula se refiere a ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). En algunas modalidades, el término macromolécula se refiere a ADN. El ADN puede ser ADN lineal o ADN circular, tal como el ADN en forma de un plásmido circular, un episoma o un vector de expresión. En ciertas modalidades preferidas, aunque no limitantes, el término macromolécula se refiere a ADN complementario (ADNc) que tiene una secuencia de ácido nucleico expresable, que incluye al menos un marco de lectura abierto operativamente unido a una o más secuencias de ácido nucleico requeridas para la transcripción de un ARNm de la secuencia de ácido nucleico expresable. Una macromolécula se puede cargar o descargar. Una molécula de ADN es un ejemplo de una macromolécula cargada. En algunos casos, el término "macromolécula", como se usa en la presente descripción, se puede usar indistintamente con los términos "ácido

nucleico expresable" y "vector de expresión". En otras modalidades, el término "macromolécula" se refiere a una molécula de ARN. La molécula de ARN puede ser cualquier tipo de molécula de ARN, que incluyen, pero no se limita a, un ARNm, un ARNip, un ARNmi, un ARN antisentido, una ribozima, o cualquier otro tipo o especie de molécula de ARN familiar para los expertos en la técnica, sin limitación, que se buscaría que se suministre al interior de una célula.

5 El término "transfección" se usa en la presente descripción para significar el suministro de ácido nucleico, proteína u otra macromolécula a una célula objetivo, de manera que el ácido nucleico, proteína u otra macromolécula se expresa o tiene una función biológica en la célula.

10 El término "ácido nucleico expresable" como se usa en la presente descripción incluye tanto ADN como ARN sin tener en cuenta el peso molecular, y el término "expresión" significa cualquier manifestación de la presencia funcional del ácido nucleico dentro de la célula que incluye, sin limitación, tanto la expresión transitoria como la expresión estable. Los aspectos funcionales incluyen la inhibición de la expresión por oligonucleótidos o suministro de proteínas.

15 El término "expresión de ácido nucleico" y sus equivalentes se refieren a la replicación del ácido nucleico en una célula, a la transcripción de ADN a ARN mensajero, a la traducción de ARN a proteína, a la modificación postraduccional de proteína, y/o a tráfico de proteínas en la célula, o variaciones o sus combinaciones.

20 El término "célula" como se usa en la presente descripción se refiere a todos los tipos de células eucariotas y procariontas. En modalidades preferidas, el término se refiere a células eucariotas, especialmente células cultivadas en cultivo, o células encontradas en un tejido en un animal o un humano. En modalidades preferidas, una célula se refiere a una célula de mamífero. En ciertas modalidades ilustrativas, aunque no limitantes, el término "célula" se refiere a cualquier célula y línea celular que se usa habitualmente en la investigación y entornos clínicos, y puede incluir líneas celulares inmortalizadas, líneas celulares transformadas, o células primarias, sin limitación.

25 La frase "difícil de transfectar", o variantes similares de la frase, cuando se usa en el contexto de procedimientos y reactivos de transfección, es un término relativo que generalmente se refiere a cualquier célula o línea celular que típicamente exhibe menos del 60 % de eficacia de la transfección cuando se transfecta mediante el uso de reactivos de transfección estándar disponibles en el comercio, tales como, por ejemplo, lípidos catiónicos (ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, LIPOFECTAMINE® 2000, LIPOFECTAMINE® LTX, LIPOFECTAMINE®, LIPOFECTIN®, FUGENE® HD, X-TREMEGENE™ HP, y similares). Las células típicamente consideradas como "difíciles de transfectar" incluyen células primarias, tales como células madre, células progenitoras, células neuronales y otros tipos de células derivadas de tejidos neurales, células sanguíneas primarias ("PBMC"), HUVEC, y similares, así como ciertas líneas celulares que, aunque establecidas, son difíciles de transfectar eficazmente mediante el uso de reactivos de transfección disponibles en el comercio. Los ejemplos de líneas celulares difíciles de transfectar incluyen, pero no se limitan a, PC12, HepG2, 3T3, LNCaP, A549, Jurkat, células primarias, células madre embrionarias H9, células madre embrionarias cultivadas, células madre pluripotentes inducidas por cultivo (células iPS), K-562, L6, L929, MCF-7, RAW 264.7, HT29, U937, Vero, HCT116, C6, C2C12, HL60, THP1, BHK, PC3, P19, SH-SY5Y, U2OS, HUH7, y PC3, entre otras. La recitación en la presente descripción de diversos tipos de células y líneas celulares específicas que se piensa en la técnica no pretende en modo alguno limitar el alcance de la presente invención únicamente a esas líneas celulares o derivados cercanos de estas, sino que simplemente pretende ilustrar la preponderancia de líneas celulares y tipos comúnmente usados en entornos de laboratorio que típicamente muestran menos del 60 % de eficacia de la transfección mediante el uso de reactivos de transfecciones catiónicos basados en lípidos comúnmente disponibles, y que se beneficiarían de las nuevas composiciones y formulaciones descritas en la presente descripción para mejorar la eficacia de la transfección relativa en al menos 5 % o más.

Por "cultivo celular" o "cultivo" se entiende el mantenimiento de las células en un ambiente artificial in vitro.

50 La "proteína recombinante" se refiere a la proteína que se codifica por un ácido nucleico que se introduce en una célula huésped. La célula huésped expresa el ácido nucleico. El término "expresar un ácido nucleico" es sinónimo de "expresar una proteína de un ARN codificado por un ácido nucleico". "Proteína", como se usa en la presente descripción, se refiere genéricamente a cualquier polímero de aminoácidos de origen natural o sintético, por ejemplo, péptidos, polipéptidos, proteínas, lipoproteínas, glicoproteínas, etc.

55 Como se usa en la presente descripción, el término "polipéptido" generalmente se refiere a un polímero de aminoácidos de origen natural, recombinante o sintético, independientemente de la longitud o la modificación postraduccional (por ejemplo, escisión, fosforilación, glicosilación, acetilación, metilación, isomerización, reducción, farnesilación, etc.), que se acoplan covalentemente entre sí mediante enlaces peptídicos secuenciales. Aunque un polipéptido "grande" se denomina típicamente en la técnica como "proteína", los términos "polipéptido" y "proteína" frecuentemente se usan indistintamente. Generalmente, se dice que el primer residuo de aminoácido o grupo de residuos de aminoácido en un polipéptido está en el "terminal amino" o "terminal N" del polipéptido. Similarmente, se dice que el último residuo de aminoácido, o grupo de residuos de aminoácido en un polipéptido está en el "terminal carboxi" o "terminal C".

65 El término "péptido" como se usa en la presente descripción pretende ser un término genérico que incluye ampliamente péptidos cortos (típicamente menos de 100 aminoácidos), polipéptidos (típicamente más de 100 aminoácidos) y proteínas (que contienen una o más cadenas de polipéptidos). Los péptidos de esta descripción típicamente tienen

más de dos aminoácidos; péptidos preferidos tienen más de 4 aminoácidos.

5 Cuando se usa en la presente descripción en el contexto de los polipéptidos descritos en la presente descripción, los términos "variante", "variantes" y similares, generalmente se refieren a polipéptido(s) que son estructuralmente similares a un polipéptido de referencia pero se caracterizan por diferencias en la secuencia de aminoácidos entre los polipéptidos y el polipéptido de referencia (por ejemplo, que tienen al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 50 %, al menos 75 %, al menos 85 %, o al menos 95 % de identidad de secuencia) y/o en presencia o ausencia de una o más modificaciones bioquímicas (por ejemplo, modificaciones postraduccionales, sustituciones, adiciones de aductos, y similares). Si bien un subconjunto de las actividades generales de ciertas variantes puede ser similar, las diferencias estructurales que ocurren entre las variantes pueden resultar en que al menos una parte de sus actividades no se superpongan. Una "variante" puede referirse a una molécula polipeptídica que se altera en una o más ubicaciones en la secuencia polipeptídica, que incluyen adiciones, deleciones, sustituciones de uno o más aminoácidos contiguos en la secuencia, así como modificaciones covalentes de la molécula, en relación con la molécula polipeptídica. Por lo tanto, en algunos casos, los términos "variante" e "isoforma" pueden usarse indistintamente. Los ejemplos ilustrativos de tales variantes incluirían, a modo de ejemplo solamente, polipéptidos en los que se ha producido el reemplazo de un grupo hidrógeno por un grupo alquilo, acilo, tiol, amida u otro grupo funcional de este tipo en uno o más residuos de aminoácidos. Una variante puede tener cambios "conservadores", en donde un aminoácido sustituido puede tener propiedades estructurales y/o químicas similares (por ejemplo, reemplazo de un residuo de aminoácido no polar con un residuo de aminoácido no polar diferente). Una variante también puede tener cambios "no conservadores" (por ejemplo, reemplazo de un residuo de aminoácido polar con un residuo de aminoácido no polar o cargado). Las variantes también pueden incluir variaciones menores similares en la secuencia de aminoácidos que incluyen, pero no se limitan a, deleciones, truncamiento, inserciones, o sus combinaciones. La orientación para determinar qué residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos, insertados, o eliminados sin abolir o afectar sustancialmente la actividad biológica está ampliamente disponible en la técnica. Se puede encontrar orientación adicional mediante el uso de programas informáticos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el software DNASTAR. Generalmente y en el contexto de la presente descripción, una variante retendrá al menos un subconjunto de las funciones biológicas típicamente asociadas con un péptido penetrante de membrana conocido, como, por ejemplo, la capacidad de facilitar la translocación de una molécula de carga, tal como, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico, a través de una membrana celular al compartimento citosólico de esta.

30 Como se usa en la presente descripción, el término "aminoácido" generalmente se refiere a aminoácidos de origen natural o sintético, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina, y metilsulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina o norvalina) o cadenas principales de péptidos modificados, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido de origen natural. El término "aminoácido" puede referirse a aminoácidos o sus derivados (por ejemplo, análogos de aminoácidos), así como a sus formas D y L. Ejemplos de tales aminoácidos incluyen glicina, L-alanina, L-asparagina, L-cisteína, ácido L-aspártico, ácido L-glutámico, L-fenilalanina, L-histidina, L-isoleucina, L-lisina, L-leucina, L-glutamina, L-arginina, L-metionina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, y L-valina, N-acetilcisteína.

50 "Kit" se refiere a la transfección, ADN, ARNi u otro suministro de carga (por ejemplo, proteína o molécula aniónica) o expresión de proteínas o kits de reducción que incluyen uno o más de los reactivos de la presente descripción o mezclas de estos. Los kits pueden incluir uno o más de los péptidos de origen no natural descritos en la presente descripción, opcionalmente con uno o más lípidos catiónicos o reactivos de transfecciones. En algunos ejemplos, el péptido y los reactivos lipídicos pueden proporcionarse en una sola formulación. En otros ejemplos, el lípido y el péptido pueden proporcionarse por separado, con instrucciones para el usuario de combinar los reactivos en el momento del uso. Tales kits pueden comprender un medio de transporte que está compartimentado para recibir en confinamiento estrecho uno o más medios recipientes tales como viales, tubos de ensayo y similares. Cada uno de dichos medios recipientes comprende componentes o una mezcla de componentes necesarios para realizar la transfección. Tales kits pueden incluir opcionalmente uno o más componentes seleccionados de cualquier molécula de carga tal como, por ejemplo, ácidos nucleicos (preferentemente uno o más vectores de expresión, moléculas de ADN, moléculas de ARN o moléculas de ARNi), células, uno o más compuestos de la presente descripción, compuestos formadores de agregados lipídicos, potenciadores de la transfección, sustancias biológicamente activas, etc.

60 El medio, los métodos, el kit y la composición de la presente descripción son adecuados ya sea para cultivo en monocapa o suspensión, transfección, y cultivo de células, y para la expresión de proteínas en células en cultivo en monocapa o suspensión. Preferentemente, el medio, los métodos, el kit y la composición de la presente descripción son para cultivo en suspensión, transfección, y cultivo de células, y para la expresión del producto proteico en células en cultivo en suspensión.

Por "recipiente de cultivo" se entiende cualquier recipiente, por ejemplo, un recipiente de vidrio, plástico o metal, que puede proporcionar un ambiente aséptico para el cultivo de células.

El término "combinación" se refiere a la mezcla o mezclado de ingredientes.

El término "vector", como se usa en la presente descripción, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un ADN circular bicatenario en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector de fago. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y de este modo se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Tales vectores se denominan en la presente descripción como "vectores de expresión recombinantes", o simplemente, "vectores de expresión". Generalmente, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante frecuentemente están en forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector más usada. Ciertos vectores usados de acuerdo con la práctica de descripción descrita en la presente descripción pueden ser vectores bien conocidos usados en la técnica, tales como, por ejemplo, pCDNA 3.3, o una versión modificada de estos. Los ejemplos no limitantes de los tipos de modificación a un vector que pueden ser adecuados en la práctica de la presente descripción incluyen, aunque no se limitan a, modificaciones tales como la adición de modificación de uno o más potenciadores, uno o más promotores, uno o más sitios de unión ribosómica, uno o más orígenes de replicación, o similares. En ciertas modalidades preferidas aunque no limitantes, y el vector de expresión usado en la práctica de la presente descripción puede incluir uno o más elementos potenciadores seleccionados para mejorar la expresión de la proteína de interés en el presente sistema de expresión transitoria. El elemento potenciador seleccionado puede colocarse 5' o 3' en la secuencia de ácido nucleico expresable usada para expresar la proteína de interés.

Como se usa en la presente descripción, la frase "vector de expresión que contiene un ácido nucleico expresable" generalmente se refiere a un vector como se definió anteriormente que es capaz de acomodar una secuencia de ácido nucleico expresable que tiene al menos un marco de lectura abierto de una proteína de interés deseada (dicha proteína de interés seleccionada por el usuario de la presente descripción) complementario a una o más secuencias de ácido nucleico o elementos que se requieren para soportar la expresión de estos en una célula o en un sistema de expresión libre de células. Tales secuencias o elementos de ácido nucleico adicionales que pueden estar presentes en un vector de expresión como se define en la presente descripción pueden incluir, una o más secuencias promotoras, uno o más elementos potenciadores, uno o más sitios de unión a ribosomas, una o más secuencias de iniciación traduccional, una o más orígenes de replicación, o uno o más marcadores seleccionables. Una variedad de secuencias de ácido nucleico o elementos que sirven para este propósito son familiares para el experto en la técnica, y la selección de una o más de estas para su uso en la práctica de la presente descripción está dentro del alcance del experto en la técnica.

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren a cualquier ácido nucleico, que incluyen ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). En modalidades preferidas, "ácido nucleico" se refiere a ADN, que incluye ADN genómico, ADN complementario (ADNc) y oligonucleótidos, que incluye ADN oligo. En ciertas modalidades preferidas, aunque no limitantes, "ácido nucleico" se refiere a ADN genómico y/o ADNc. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse a un polímero mediante ADN o ARN polimerasa o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación de la estructura de nucleótidos puede impartirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes que no son nucleótidos. Un polinucleótido puede comprender modificaciones realizadas después de la síntesis, tal como la conjugación a un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "caperuzas", sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos que contienen porciones colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellos que contienen alquiladores, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anomérico, etc.), así como formas no modificadas de los polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presentes en los azúcares puede reemplazarse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse por grupos protectores estándar, o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o puede conjugarse a soportes sólido o semisólidos. El OH terminal 5' y 3' puede fosforilarse o sustituirse con aminas o grupos orgánicos de grupos protectores de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que generalmente se conocen en la técnica, que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alilo-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares a-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosa o

lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos, y análogos básicos de nucleósidos tales como metil ribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no se limitan a, modalidades en donde el fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("dilitioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO, o CH₂ ("formacetal"), en el que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que contiene opcionalmente un enlace éter (--O--), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en la presente descripción, que incluyen ARN y ADN.

Como se usa en la presente descripción, el término "interferencia por ARN" o "ARNi" generalmente se refiere al proceso de silenciamiento de genes postranscripcional específico de secuencia. El ARNi es un proceso mediante el cual los ARNm específicos se degradan en ARN cortos. Para mediar el ARNi, un ARN bicatenario (ARNbc) con una identidad de secuencia sustancial con el ARNm objetivo se introduce en una célula. El ARNm objetivo después se degrada en la célula, lo que resulta en niveles disminuidos de ese ARNm y la proteína que codifica.

Como se usa en la presente descripción, el término "constructo de ARNi" generalmente se refiere a pequeños ARN de interferencia (ARNip), ARN en horquilla, y otras especies de ARN que pueden escindirse in vivo para formar los ARNip. El término también abarca vectores de expresión capaces de dar lugar a transcripciones que forman los ARNbc o horquillas ARN en células, y/o transcripciones que pueden producir ARNip in vivo. El término "vector de expresión de ARNi" se refiere a constructos de ácido nucleico replicables usados para expresar (transcribir) ARN que produce dúplex de ARNip en una célula huésped en la que se expresa el constructo.

Como se usa en la presente descripción, el término "ARN de interferencia corta" o "ARNip" generalmente se refiere a una molécula de ARN bicatenaria corta (aproximadamente de 19 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud) de secuencia de nucleótidos definida que es capaz de mediar ARNi.

Como se usa en la presente descripción, los términos "reacción de formación del complejo", "medio de formación del complejo" o similares, generalmente se refieren a un medio de cultivo o reacción fisiológicamente aceptable en el que un ácido nucleico está en complejo con una formulación de reactivo de transfección. Típicamente, un ácido nucleico que se introduce en una célula para el propósito de expresar una proteína está en complejo primero con un reactivo de transfección adecuado (tal como, por ejemplo, una formulación de lípidos catiónicos) a complejos o agregados lipídicos/ácidos nucleicos.

Fármaco se refiere a cualquier agente terapéutico o profiláctico distinto de los alimentos que se usa en la prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento, o cura de enfermedades en el hombre o animales.

Una variedad de técnicas y reactivos están disponibles para la introducción de macromoléculas en una célula objetivo en un proceso conocido como "transfección". Los reactivos usados comúnmente incluyen, por ejemplo, fosfato de calcio, DEAE-dextrano y lípidos. Para ejemplos de protocolos detallados para el uso de reactivos de este tipo, hay numerosos textos de referencia disponibles, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 9, Ausubel, y otros Eds., John Wiley y Sons, 1998. En la técnica se conocen métodos adicionales para transfectar células, y pueden incluir electroporación (electrotransferencia génica), sonoporación, transfección óptica, fusión de protoplastos, impalefección, magnetofección, o transducción viral.

Un "reactivo para la introducción de macromoléculas" en células o un "reactivo de transfección" es cualquier material, formulación o composición conocida por los expertos en la técnica que facilita la entrada de una macromolécula en una célula. Por ejemplo, ver la patente de Estados Unidos núm. 5.279.833. En algunas modalidades, el reactivo puede ser un "reactivo de transfección" y puede ser cualquier compuesto y/o composición que aumente la absorción de uno o más ácidos nucleicos en una o más células objetivo. Los expertos en la técnica conocen una variedad de reactivos de transfección. Los reactivos de transfección adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, uno o más compuestos y/o composiciones que comprenden polímeros catiónicos tales como polietiliminina (PEI), polímeros de aminoácidos cargados positivamente tales como polilisina y poliarginina, dendrímeros cargados positivamente y dendrímeros fracturados, polímeros que contienen β-ciclodextrina catiónicos (polímeros CD), DEAE-dextrano y similares. En algunas modalidades, un reactivo para la introducción de macromoléculas en las células puede comprender uno o más lípidos que pueden ser lípidos catiónicos y/o lípidos neutros. Los lípidos preferidos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), dioleoilfosfatidilcolina (DOPE), 1,2-Bis(oleoiloxi)-3-(4'-trimetilamonio) propano (DOTAP), 1,2-dioleoil-3-(4'-trimetilamonio) butanoil-sn-glicerol (DOTB), éster de 1,2-dioleoil-3-succinil-sn-glicerol colina (DOSC), butanoato de colesterol (4'-trimetilamonio) (ChoTB), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), bromuro de 1,2-dioleoil-3-dimetil-hidroxietilamonio (DORI), 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetil bromuro de hidroxietilamonio (DORIE), bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio (DMRIE), cloruro de O,O'-didodecil-N-[p(2-trimetilamonioetiloxi)benzoil]-N,N,N-trimetilamonio, espermina conjugada con uno o más lípidos (por ejemplo, 5-carboxiespermilglicina dioctadecilamida (DOGS), N,N^I,N^{II},N^{III}-tetrametil-N,N,N^I,N^{II},N^{III}-tetrapalmitilespermina (TM-TPS) y dipalmitoilfosfatidiletanolamina 5-carboxiespermilamida (DPPES)), lipopolilisina (polilisina conjugada con DOPE), TRIS (Tris(hidroximetil)aminometano, trometamina) ácidos grasos conjugados (TFA) y/o péptidos tales como trilisil-alanil-TRIS mono-, di- y tri-palmitato, (3β-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil] colesterol (DC-Chol), cloruro de N-(α-trimetilamonioacetil)-didodecil-D-glutamato (TMAG), bromuro de dimetil

dioctadecilamonio (DDAB), 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminiumtrifluoroacetato (DOSPA) y sus combinaciones.

Los expertos en la técnica apreciarán que se ha demostrado que ciertas combinaciones de los lípidos mencionados anteriormente son particularmente adecuadas para la introducción de ácidos nucleicos en las células, por ejemplo, está disponible en Life una combinación 3:1 (p/p) de DOSPA y DOPE Technologies Corporation, Carlsbad, California bajo el nombre comercial LIPOFECTAMINE™, una combinación 1:1 (p/p) de DOTMA y DOPE está disponible en Life Technologies Corporation, Carlsbad, California bajo el nombre comercial LIPOFECTIN®, una combinación 1:1 (M/M) de DMRIE y colesterol está disponible en Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, bajo el nombre comercial de reactivo DMRIE-C, una combinación 1:1,5 (M/M) de TM-TPS y DOPE está disponible en Life Technologies Corporation, Carlsbad, California bajo el nombre comercial CELLFECTIN® y una combinación 1:2,5 (p/p) de DDAB y DOPE está disponible en Life Technologies Corporation, Carlsbad, California bajo el nombre comercial LIPFECTACE®. Además de las combinaciones de lípidos mencionadas anteriormente, los expertos en la técnica conocen otras formulaciones que comprenden lípidos en mezcla con otros compuestos, particularmente, en mezcla con péptidos y proteínas que comprenden secuencias de localización nuclear. Por ejemplo, ver la solicitud internacional núm. PCT/US99/26825, publicado como documento núm. WO 00/27795.

Se ha encontrado que los agregados lipídicos tales como los liposomas son útiles como agentes para el suministro de macromoléculas a las células. Particularmente, se ha demostrado que los agregados lipídicos que comprenden uno o más lípidos catiónicos son extremadamente eficaces en el suministro de macromoléculas aniónicas (por ejemplo, ácidos nucleicos) a las células. Un lípido catiónico de uso común es el cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA). Los liposomas que comprenden DOTMA solo o como una mezcla 1:1 con dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) se han usado para introducir ácidos nucleicos en las células. Una mezcla 1:1 de DOTMA:DOPE está disponible en el comercio en Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, bajo el nombre comercial de LIPOFECTIN™. Otro lípido catiónico que se ha usado para introducir ácidos nucleicos en las células es el 1,2-bis(oleoil-oxi)-3-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP). DOTAP se diferencia de DOTMA en que las porciones oleoil se enlazan a la cadena principal de propilamina a través de enlaces de éter en DOTAP, mientras que se enlazan a través de enlaces éster en DOTMA. Se cree que DOTAP se degrada más fácilmente por las células objetivo. Un grupo estructuralmente relacionado de compuestos en donde uno de los grupos metilo de la porción trimetilamonio se reemplaza con un grupo hidroxietilo tiene una estructura similar al inhibidor de Rosenthal (RI) de la fosfolipasa A (ver Rosenthal, y otros, (1960) J. Biol. Chem. 233: 2202-2206.). El RI tiene ésteres estearoilicos enlazados al núcleo de propilamina. Los análogos de dioleoil de RI se abrevian comúnmente como DOR1-éter y DOR1-éster, dependiendo del enlace de la porción lipídica con el núcleo de propilamina. El grupo hidroxilo de la porción hidroxietilo puede derivatizarse adicionalmente, por ejemplo, por esterificación a carboxiespermina.

Otra clase de compuestos que se ha usado para la introducción de macromoléculas en las células comprende una porción de carboxiespermina unida a un lípido (ver, Behr, y otros, (1989) Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 86: 6982-6986 y documento núm. EPO 0 394 111). Los ejemplos de compuestos de este tipo incluyen dipalmitoilfosfatidiletanolamina 5-carboxiespermilamida (DPPES) y 5-carboxiespermilglicina dioctadecilamida (DOGS). DOGS está disponible en el comercio en Promega, Madison, Wisconsin, bajo el nombre comercial de TRANSFECTAM™.

Un derivado catiónico del colesterol (3p-[N-(N',N'-dimetilamino)etanol]-carbamoil] colesterol, DC-Chol) se ha sintetizado y formulado en liposomas con DOPE (ver Gao, y otros, (1991) BBRC 179 (1): 280-285.) y se usa para introducir ADN en las células. Se informó que los liposomas así formulados introducen eficientemente ADN en las células con un bajo nivel de toxicidad celular. Se ha informado que la lipopolilisina, formada al conjugar la polilisina con DOPE (ver Zhou, y otros, (1991) BBA 1065: 8-14), es efectiva para introducir ácidos nucleicos en las células en presencia de suero.

Otros tipos de lípidos catiónicos que se han usado para introducir ácidos nucleicos en las células incluyen lípidos de amonio policationico, sulfonio y fosfonio altamente empaquetados, tal como los descritos en la patente de Estados Unidos núms. 5,674,908 y 5,834,439, y la solicitud internacional núm. PCT/US99/26825, publicado como documento núm. WO 00/27795. Un reactivo de transfección particularmente preferido, aunque no limitante para el suministro de macromoléculas de acuerdo con la presente descripción es LIPOFECTAMINE 2000™ que está disponible en Life Technologies (ver la solicitud internacional de Estados Unidos núm. PCT/US99/26825, publicada como documento núm. WO 00/27795). Otro reactivo de transfección preferido, aunque no limitante, adecuado para el suministro de macromoléculas a una célula es EXPIFECTAMINE™. Otros reactivos de transfección adecuados incluyen LIOFECTAMINE™ RNAiMAX, LIPOFECTAMINE™ LTX, OLIGOFECTAMINE™, Cellfectin™, INVIVOFECTAMINE™, INVIVOFECTAMINE™ 2.0, y cualquiera de los reactivos lipídicos o formulaciones descritos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2012/0136073, de Yang y otros. El experto en la técnica conoce una variedad de otros reactivos de transfección y se puede evaluar su idoneidad para los sistemas y métodos de transfección transitorios descritos en la presente descripción.

La presente invención proporciona reactivos y composiciones mejorados que son adecuados para la transfección de células. Particularmente, la presente invención proporciona composiciones y reactivos que potencian la eficacia de la transfección de todas las células, que incluyen los tipos de células que se consideran típicamente difíciles de transfectar. Las composiciones y reactivos de la presente invención, cuando se usan de acuerdo con los métodos

descritos en la presente descripción, así como con el conocimiento general y la experiencia dentro del ámbito de alguien con un nivel de habilidad ordinario en la técnica, pueden aumentar típicamente la eficacia de la transfección de tales células hasta 10 %, hasta 15 %, 20 %, hasta 25 %, hasta 30 %, hasta 35 %, hasta 40 %, hasta 45 %, hasta 50 %, hasta 55 %, hasta 60 %, hasta 65 %, hasta 70 %, hasta 75 %, hasta 80 %, hasta 85 %, hasta 90 %, hasta 95 %, hasta 100 % o más del 100 %. La invención logra esto proporcionando péptidos novedosos que comprenden una secuencia peptídica penetrante de célula/membrana usada en combinación con uno o más lípidos de transfección para el suministro de una molécula de carga, particularmente, pero no limitado a, una molécula de ácido nucleico tal como una molécula de ADN o un molécula de ARN, al compartimento interior o citoplasmático de una célula en cultivo o una célula o tejido in vivo, particularmente, pero no limitado a, una célula que se considera "difícil de transfectar", como se describe con mayor detalle a continuación.

Péptidos penetrantes de membrana/célula

La presente descripción se dirige a péptidos sintéticos de origen no natural que se usan en combinación con reactivos de transfección, cuyos reactivos de transfecciones pueden incluir preferentemente, aunque no limitado a, reactivos de transfección basados en lípidos, particularmente reactivos de transfección basados en lípidos catiónicos, cuya inclusión en un complejo de transfección mejoran la eficacia de la transfección de las células en parte potenciando el transporte de una molécula de carga, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico o cualquier otra molécula de carga adecuada, tal como será fácilmente evidente para un experto en la técnica, a través de la membrana celular de tal manera que la molécula de carga se entrega al compartimento citosólico de una célula en cultivo o en un tejido in vivo.

Idealmente, los péptidos de origen no natural de la presente descripción se usarán para formar un complejo de múltiples componentes con una composición del agregado lipídico y la molécula de carga de manera que el complejo potencie el suministro de la molécula de carga al compartimento citosólico de la célula o tejido.

En un aspecto de la descripción, los péptidos de origen no natural se ponen en contacto con al menos un reactivo de transfección y al menos una molécula de carga para formar un complejo de transfección que comprende el reactivo de transfección, la carga, y el péptido, y se caracterizan por mejorar la eficacia de la transfección (medida como una transferencia mejorada de la carga al interior de una célula en cultivo o en un tejido in vivo) de un complejo en comparación con un complejo de transfección idéntico que carece del péptido de origen no natural.

La selección de lo que constituye un reactivo de transfección óptimo para usar con la presente descripción depende de la identidad y la naturaleza de la carga que se entrega, la identidad y las características de las células que se transfectan, donde la transfección se lleve a cabo en células aisladas en cultivo o en un tejido en un animal o un humano in vivo, y la identidad del péptido de origen no natural. Todas estas características son bien conocidas por el profesional que tiene un nivel de habilidad ordinario en la técnica y la selección de un reactivo de transfección óptimo en el contexto específico de aplicaciones específicas, así como la forma de determinar qué constituye la concentración óptima y la formulación de los componentes son fácilmente evidentes para una persona sin experimentación indebida y sin apartarse del espíritu y el alcance de la descripción.

En ciertos ejemplos preferidos, aunque no limitantes, el reactivo de transfección seleccionado para usar en la formación de un complejo de transfección de acuerdo con los ejemplos expuestos en la presente descripción puede ser un lípido catiónico, particularmente un lípido catiónico capaz de formar agregados de lípidos.

En algunos ejemplos, un complejo de transfección puede incluir una composición de agregado lipídico, la composición del agregado lipídico que comprende al menos un lípido catiónico, opcionalmente más de un lípido catiónico, opcionalmente en presencia de al menos un lípido auxiliar, en contacto con una molécula de carga y al menos un péptido de origen no natural que tiene la estructura general:

A-L-B,

o

B-L-A;

Cuando A es un péptido penetrante de membrana (MPP), L es ya sea un enlace covalente que enlaza A a B o un péptido enlazador, y donde B es ya sea un polipéptido catiónico, una porción catiónica o un péptido catiónico enlazado covalentemente a una porción catiónica, donde el péptido de origen no natural se caracteriza porque la presencia de péptido de origen no natural como un componente de un complejo de transfección aumenta la eficacia de la transfección del complejo de transfección se potencia o mejora hasta 10 %, hasta 15 %, 20 %, hasta 25 %, hasta 30 %, hasta 35 %, hasta 40 %, hasta 45 %, hasta 50 %, hasta 55 %, hasta 60 %, hasta 65 %, hasta 70 %, hasta 75 %, hasta 80 %, hasta 85 %, hasta 90 %, hasta 95 %, hasta 100 %, hasta 150 %, hasta 200 %, hasta 250 %, hasta 300 %, hasta 350 %, hasta 400 %, hasta 500 % o de más de 500 % por encima de un complejo de transfección idéntico que carece del péptido de origen no natural.

A puede ser cualquier péptido, sin limitación e independiente del mecanismo por el cual el péptido lleva a cabo su

función, que se conoce o se puede demostrar que potencia o promueve la transferencia de una molécula, tal como una molécula de carga como se definió anteriormente, particularmente una molécula de ácido nucleico tal como una molécula de ADN o ARN, desde un compartimento extracelular, tal como, por ejemplo, un medio de cultivo celular o un fluido intersticial o corporal, a través de una membrana celular de manera que la molécula de carga se transporta al compartimento citoplasmático de la célula donde puede efectuar al menos una respuesta o función biológica medible. La determinación de lo que constituye "mejora" de la transferencia a través de una membrana celular está dentro del nivel de habilidad de un profesional que tiene un nivel de habilidad ordinario en la técnica, y la identificación de un péptido o variante adecuado de un péptido conocido que funciona para potenciar o promover la transferencia de una molécula de carga de manera que es evidente para una persona que usa una amplia variedad de técnicas conocidas.

En algunos ejemplos no limitantes, la secuencia peptídica de A puede estar entre aproximadamente 5 a aproximadamente 75 aminoácidos, entre aproximadamente 5 a aproximadamente 60 aminoácidos, entre aproximadamente 5 a aproximadamente 50 aminoácidos, entre aproximadamente 5 a aproximadamente 40 aminoácidos, entre aproximadamente 5 a aproximadamente 30 aminoácidos, entre aproximadamente 5 a aproximadamente 20 aminoácidos o entre aproximadamente 5 a aproximadamente 15 aminoácidos, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 75 aminoácidos, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 60 aminoácidos, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 50 aminoácidos, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 40 aminoácidos, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 30 aminoácidos, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos, o entre aproximadamente 10 a aproximadamente 15 aminoácidos, y donde A se caracteriza porque la presencia del péptido no natural como componente de un complejo de transfección potencia la eficacia de la transfección del complejo de transfección hasta 10 %, hasta 15 %, 20 %, hasta 25 %, hasta 30 %, hasta 35 %, hasta 40 %, hasta 45 %, hasta 50 %, hasta 55 %, hasta 60 %, hasta 65 %, hasta 70 %, hasta 75 %, hasta 80 %, hasta 85 %, hasta 90 %, hasta 95 %, hasta 100 %, hasta 150 %, hasta 200 %, hasta 250 %, hasta 300 %, hasta 350 %, hasta 400 %, hasta 500 % o de más de 500 % por encima de un complejo de transfección idéntico que carece del péptido de origen no natural.

Una variedad de secuencias peptídicas adecuadas para su uso como MPP (es decir, la región A de la estructura A-L-B o B-L-A mostrada anteriormente) en los péptidos de origen no natural como se describe en la presente descripción son conocidos en la técnica, cualquiera de los cuales puede usarse en la práctica de la presente descripción sin limitación. En la Tabla 1 se muestra un conjunto representativo, aunque no limitante, de péptidos que se conoce que funcionan como un MPP.

En algunos ejemplos no limitantes, A es un péptido que comprende una secuencia peptídica seleccionada de una cualquiera de las SEQ ID NO. 1 - 68, o una variante de esta que tiene al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de similitud de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 1-68 y que retiene al menos 50 % al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 %, al menos 155 %, mayor que 100 %, hasta 115 %, hasta 120 %, hasta 130 %, hasta 140 %, hasta 150 %, hasta 160 %, hasta 170 %, hasta 180 % de la función de estas para potenciar el suministro de una molécula de carga al interior de una célula.

En algunos ejemplos, L puede ser un enlace covalente que enlaza A y B.

En algunos ejemplos, L puede comprender un dipéptido de aminoácidos neutros (sin carga a pH fisiológico) en el que opcionalmente uno de los dos aminoácidos en el dipéptido comprende al menos una cadena lateral polar. En un ejemplo, L puede comprender un dipéptido que comprende al menos una cadena lateral polar o al menos una cadena lateral hidrofóbica, en donde dicha cadena lateral polar o hidrofóbica preferentemente no es una cadena lateral voluminosa. En un ejemplo, L puede comprender un dipéptido que comprende al menos una glicina, al menos una valina, al menos una alanina, al menos una serina o al menos una treonina. En algunos ejemplos, L puede comprender un dipéptido seleccionado de la lista que consiste en GG, AA, GA, AG, AS, AY, GS, GT, GV, AV, SV, TV, VG, VA, y VT.

En algunos ejemplos, L puede ser un péptido enlazador que tiene entre aproximadamente 3 a aproximadamente 50, aproximadamente 45, aproximadamente 40, aproximadamente 35, aproximadamente 30, aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 15, aproximadamente 14, aproximadamente 13, aproximadamente 12, aproximadamente 11, aproximadamente 10, aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6, aproximadamente 5, aproximadamente 4 aminoácidos, donde al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 % o más de aproximadamente 90 % de los aminoácidos son neutros.

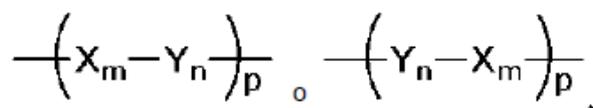
En algunos ejemplos, L puede ser un péptido enlazador que tiene entre aproximadamente 3 a aproximadamente 50, aproximadamente 5 a aproximadamente 25, aproximadamente 6 a aproximadamente 20, aproximadamente 8 a aproximadamente 15 aminoácidos, o aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 aminoácidos, donde hasta aproximadamente 35 % de los aminoácidos contiene una cadena lateral polar neutra, y/o al menos el 35 % de los aminoácidos contiene una cadena lateral hidrofóbica,

donde las cadenas laterales polares e hidrofóbicas no son cadenas laterales voluminosas.

En algunos ejemplos, L puede ser un péptido enlazador que tiene entre aproximadamente 3 a aproximadamente 50, aproximadamente 5 a aproximadamente 25, aproximadamente 6 a aproximadamente 20, aproximadamente 8 a aproximadamente 15 aminoácidos, o aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 aminoácidos, donde hasta aproximadamente 35 % de los aminoácidos se seleccionan entre serina, treonina, valina, isoleucina, y leucina.

En algunos ejemplos, L puede ser un péptido enlazador que tiene entre aproximadamente 3 a aproximadamente 50, aproximadamente 5 a aproximadamente 25, aproximadamente 6 a aproximadamente 20, aproximadamente 8 a aproximadamente 15 aminoácidos, o aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 aminoácidos, donde al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 % o más de los aminoácidos son glicina o alanina.

En algunos ejemplos, L puede ser un péptido enlazador que tiene la estructura:



donde cada X es un aminoácido neutro independientemente con una cadena lateral no polar, donde cada Y es independientemente un aminoácido neutro con una cadena lateral polar, y donde m es un número entero de 3 a 10, donde n es un número entero de 1 a 5, y donde cuando L no es un enlace, p es un número entero de 1 a 20. En un ejemplo, m > n. En algunas modalidades, m es 2 y n es 1, o m es 3 y n es 1 o 2. En algunos ejemplos, cada X es independientemente glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina. En algunos ejemplos, cada Y es independientemente serina o treonina.

Puede usarse en la práctica de la presente descripción una variedad de secuencias peptídicas adecuadas para usar como un enlazador (es decir, la región L de la estructura A-L-B o B-L-A mostrada anteriormente) en los péptidos de origen no natural como se describe en la presente descripción, cualquiera de los cuales puede usarse en la práctica de la presente descripción sin limitación. Un conjunto representativo, aunque no limitante de péptidos enlazadores que se contempla para su uso con los ejemplos descritos en la presente descripción se expone en la Tabla 2.

En algunos ejemplos no limitantes, L es un péptido que comprende una secuencia peptídica seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO. 69-81, o una variante de esta que tiene al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de similitud de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO. 69-81 y que retiene al menos 50 % al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 %, al menos 155 %, mayor que 100 %, hasta 115 %, hasta 120 %, hasta 130 %, hasta 140 %, hasta 150 %, hasta 160 %, hasta 170 %, hasta 180 % de la función para potenciar el suministro de una molécula de carga al interior de una célula.

En algunos ejemplos, B puede ser un polipéptido catiónico, una porción catiónica, o un péptido catiónico enlazado covalentemente a una porción catiónica. Cualquier porción catiónica conocida en la técnica para impartir una carga catiónica a una molécula, particularmente un péptido, puede seleccionarse para su uso en la presente descripción, sin limitación. Los ejemplos preferidos, aunque no limitantes, de porciones catiónicas adecuadas para usar en la presente descripción incluyen poliaminas, tales como, por ejemplo, uno o más de putrescina, cadaverina, espermina, espermidina. Las porciones catiónicas adicionales pueden incluir poli-L-lisina.

En algunos ejemplos, B puede ser un péptido que tiene una secuencia peptídica entre aproximadamente 3 a aproximadamente 50 aminoácidos, aproximadamente 5 a aproximadamente 25, aproximadamente 6 a aproximadamente 20, aproximadamente 8 a aproximadamente 15 aminoácidos, o aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 aminoácidos, donde al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o al menos 95 % de los aminoácidos están cargados positivamente a pH fisiológico.

Una variedad de secuencias peptídicas adecuadas para su uso como una región catiónica (es decir, la región B de la estructura A-L-B o B-L-A mostrada anteriormente) en los péptidos de origen no natural como se describe en la presente descripción puede usarse en la práctica de la presente descripción, cualquiera de las cuales puede usarse en la práctica de la presente descripción sin limitación. Un conjunto representativo, aunque no limitante de péptidos enlazadores que se contemplan para su uso con los ejemplos descritos en la presente descripción se exponen en la Tabla 3.

ES 2 808 866 T3

Tabla 1. Secuencias ilustrativas de péptidos penetrantes de membrana (MPP)

Nombre	Secuencia peptídica	SEQ ID NO:
DPV10/6	SRRARRSPRESGKKRKRKR	1
DPV15b	CGAYDLRRRERQSRLRRRERQSR	2
YM-3	GYGRKKRRGRRRTHRLP	3
Penetración	IGCRH	4
Tat(46-57)	RQIKIWFQNRMRMKWKK	5
LR11	RILQQLLFIHF	6
C45D18	DTWAGVEAIIRILQQLLFIHFR	7
Lyp-1	CGNKRTRGC	8
Lyp-2	CAGRRSAYC	9
(42-38)(9-1)Crot	GSGKKGGKKHCQKY	10
(1-9)(38-42)Crot	YKQCHKKGGKKGSG	11
BMV GAG	KMTRAQRRAAARRNRWTARGC	12
hPER1-PTD (830-846)NLS	GRRHHCRSKAKRSRHH	13
HLF1	KCFWQRNMRKVRGPPVSCIQR	14
hLF2	KCFWQRNVKVRGPPVSCIQR	15
hLF3	KCFWQRNIRKVRGPPVSCIQR	16
hLF4	KCFWQRNXRKVRGPPVSCIQR, donde X es norvalina	17
hLF5	KCFWQRNLRKVRGPPVSCIQR	18
hLF6	KCFWQRNXRKVRGPPVSCIQR, donde X es norleucina	19
hLF7	CFWQRNVKVRGPPVSC	20
hLF8	CFWQRNIRKVRGPPVSC	21
hLF9	CFWQRNXRKVRGPPVSC, donde X es norvalina	22
hLF10	CFWQRNLRKVRGPPVSC	23
hLF11	CFWQRNXRKVRGPPVSC, donde X es norleucina	24
hLF12	FQWQRNVKVRGPPVS	25
hLF13	FQWQRNIRKVRGPPVS	26
hLF14	FQWQRNVKVRGPPVS, donde X es norvalina	27
hLF15	FQWQRNLRKVRGPPVS	28
hLF16	FQWQRNXRKVRGPPVS, donde X es norleucina	29
hLF17	FQWQRNVKVR	30
hLF18	FQWQRNIRKVR	31
hLF19	FQWQRNXRKVR, donde X es norvalina	32
hLF20	FQWQRNLRKVR	33
hLF21	FQWQRNXRKVR donde X es norleucina	34
hLF22	CFWQRNMRKVRGPPVSC	35
C45D18	DTWAGVEAIIRILQQLLFIHFRIGCRH	36
LR20	RILQQLLFIHFRIGCRHSRI	37
LR17	RILQQLLFIHFRIGCRH	38
LR15	RILQQLLFIHFRIGC	39
LR15DL	RIFIHFRIGC	40
LR8DHF	RIFIRIGC	41
LR8DHFRI	RIFIGC	42
LR8DRIHF	FIRIGC	43
Tat	YGRKKKRRQRRR	44
Δ NTat	RKKRRQRRR	45
Antp	RQIKIWFQNRMRMKWKK	46
bLF	PEWFKCRRWQWRMCKLGA	47
bLF2	KCRRWQWRMCKLGAPSITCVR	48
bLF3	CRRWQWRMCKLGAPSITC	49
LF1	FQWQRNMRKVRGPPVS	50
LF2	FQWQRNMRKVR	51
SynB1	GGRLSYSRRRFSTSTGR	52
Penetratina PTD	RQIKIWFQNRMRMKWKK	53
PTD-4	PIRRRKLRLK	54
PTD-5	RRQRRTSKLMKR	55
FHV Coat-(35-49)	RRRRNRTRNRNRVR	56
BMV Gag-(7-25)	KMTRAQRRAAARRNRWTAR	57
HTLV-II Rex-(4-16)	TRRQRTRRRARRNR	58

65

Nombre	Secuencia peptídica	SEQ ID NO:
D-Tat	GRKKRRQRRRPPQ	59
R9-Tat	GRRRRRRRRRPPQ	60
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	61
MAPA	KLALKLALKLALAKLA	62
SBP	MGLGLHLLVLAALQGAWSQPKKKRKV	63
FBP	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	64
MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	65
MPG(Δ NLS)	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV	66
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	67
Pep-2	KETWFETWFTEWSQPKKKRKV	68

Tabla 2. Secuencias ilustrativas de péptido enlazador (L)

Nombre	Secuencia peptídica	SEQ ID NO:
Enlazador 1	GGGSGGGSGGGS	69
Enlazador 2	GGSGGGSGGSGGS	70
Enlazador 3	GGGGGGGGGGGG	71
Enlazador 4	GGSGGGSGGGSGGGS	72
Enlazador 5	GGGAGGGAGGGAGGGA	73
Enlazador 6	GGGAGGGSGGGAGGGS	74
Enlazador 7	AAAAAAAAAAAA	75
Enlazador 8	AAASAAASAAAS	76
Enlazador 9	AAASAAASAAASAAAS	77
Enlazador 10	AAGSAAGSAAGS	78
Enlazador 11	AGGSAGGSAGGS	79
Enlazador 12	GGGTGGGTGGGT	80
Enlazador 13	AAATAAATAAAT	81

Tabla 3. Secuencias ilustrativas de polipéptidos catiónicos (CP)

CP1	RRRRRRRRRRR	82
CP2	RRRRRRRRRRRRRRRR	83
CP3	RRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR	84
CP4	KKKKKKKKKKK	85
CP5	RRRRHRRRRHRRRRH	86
CP6	RRRKRRRKRRRK	87
CP7	KKKKRKKKKRKKKKR	88

La Tabla 4 expone diversas secuencias peptídicas que pueden usarse en la práctica de la presente invención. Por el contrario, será fácilmente evidente que, en base a las enseñanzas expuestas anteriormente con respecto a las regiones A, L y B de los péptidos descritos, es posible una gran cantidad de péptidos que son potencialmente útiles en la práctica de la descripción establecida en la presente descripción. Además, está dentro del alcance del experto en la técnica determinar si una secuencia peptídica dada cae dentro del alcance de la descripción mediante el uso de técnicas estándar en la técnica, sin requerir una experimentación excesiva. Además, se apreciará que diversas variantes de las secuencias peptídicas que aparecen en la Tabla 4 también caen dentro del alcance de la descripción, siempre que dichas variantes satisfagan las características estructurales y funcionales expuestas anteriormente. Las variantes de las secuencias peptídicas que aparecen en la Tabla 4, o de cualquier otro péptido candidato que no se mencione explícitamente en la Tabla 4 pero que satisfaga los requisitos estructurales y funcionales establecidos anteriormente pueden incluir deleciones, inserciones, sustituciones con aminoácidos de origen natural o no proteínogénicos.

Tabla 4. Péptidos ilustrativos de origen no natural

Nombre	Secuencia peptídica	SEQ ID NO:
Péptido 1	SRRARRSPRESGKKRKRKRGGGSGGGSGGGSRRRRRRRRRRR	89
Péptido 2	CGAYDLRRRERQSRLRRRERQSRGGGSGGGSGGGSRRRRRRRRRRR	90
Péptido 3	GYGRKKRRGRRRTHRLPGGGSGGGSGGGSRRRRRRRRRRR	91
Péptido 4	IGCRHGGGSGGGSGGGSRRRRRRRRRRR	92
Péptido 5	CGNKRTRGCGGGSGGGSGGGSRRRRRRRRRRR	93
Péptido 6	CARRSAYCGGGSGGGSGGGSRRRRRRRRRRR	94
Péptido 7	GSGKKGGKHCQKYGGGSGGGSGGGSRRRRRRRRRRR	95
Péptido 8	YKQCHKKGGKKGSGGGSGGGSGGGSRRRRRRRRRRR	96
Péptido 9	KMTRAQRRAAARNRWARTARGCGGGSGGGSGGGSRRRRRRRRRRR	97
Péptido 10	RRHHCRSKAKRSRHHGGGSGGGSGGGSRRRRRRRRRRR	98
Péptido 11	KCFWQRNMRKVRGPPVSCIKRGGGSGGGSGGGSRRRRRRRRRRR	99
Péptido 12	PEWFKCRRWQWRMCKLGAGGSGGGSGGGSKKKKKKKKKKK	100
Péptido 13	KCFWQRNVRKVRGPPVSCIKRAAGSAAGSAAGSKKKKRKKKKRKKR	102
Péptido 14	GRRHHCRSKAKRSRHHGGGSGGGSGGGSRRRRRRRRRRR	103
Péptido 15	CGNKRTRGCGGGGGGGRRRRRKRRRRKRRRRK	104
Péptido 16	KCRRWQWRMCKLGAPSITCVRR	105
Péptido 17	RQIKIWFQNRMRKWKRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR	106
Péptido 18	RQIKIWFQNRMRKWKAAASAAASAAASRRRKKRKRKK	107

En algunos ejemplos, la secuencia peptídica de A está entre 5 a aproximadamente 50 aminoácidos, y A se caracteriza porque mejora el suministro de una molécula a una célula en presencia de un reactivo de transfección catiónico basado en lípidos en al menos 10 % o más, al menos 15 % o más, al menos 20 % o más, al menos 25 % o más, al menos 30 % o más, al menos 35 % o más, al menos 40 % o más, al menos 45 % o más, al menos 50 % o más, al menos 55 % o más, al menos 60 % o más, al menos 65 % o más, al menos 70 % o más, al menos 75 % o más, al menos 80 % o más, al menos 85 % o más, al menos 90 % o más, al menos 95 % o más, al menos 100 %, al menos 200 % o más, al menos 250 % o más, al menos 300 % o más, al menos 350 % o más, al menos 400 % o más, al menos 500 % o más, al menos 600 % o más, al menos 700 % o más, al menos 800 % o más, al menos 900 % o más, al menos 1000 % o más al menos 1500 % o más o al menos 2000 % o más.

En algunos ejemplos, A es al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % similar a cualquiera de las secuencias peptídicas expuestas en la Tabla 1, y A se caracteriza porque mejora el suministro de una molécula en una célula en al menos 10 % o más, al menos 15 % o más, al menos 20 % o más, al menos 25 % o más, al menos 30 % o más, al menos 35 % o más, al menos 40 % o más, al menos 45 % o más, al menos 50 % o más, al menos al menos 55 % o más, al menos 60 % o más, al menos 65 % o más, al menos 70 % o más, al menos 75 % o más, al menos 80 % o más, al menos 85 % o más, al menos 90 % o más, al menos 95 % o más, al menos 100 %, al menos 200 % o más, al menos 250 % o más, al menos 300 % o más, al menos 350 % o más, al menos 400 % o más, al menos 500 % o más, al menos 600 % o más, al menos 700 % o más, al menos 800 % o más, al menos 900 % o más, al menos 1000 % o más al menos 1500 % o más o al menos 2000 % o más.

En algunos ejemplos, A puede comprender cualquiera o más de las secuencias peptídicas establecidas en la SEQ ID NO. 1 - 68, o una de sus variantes de esta siendo al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % similar al mismo y que tenga al menos 10 % o más, al menos 15 % o más, al menos 20 % o más, al menos 25 % o más, al menos 30 % o más, al menos 35 % o más, al menos 40 % o más, al menos 45 % o más, al menos 50 % o más, al menos 55 % o más, al menos 60 % o más, al menos 65 % o más, al menos 70 % o más, al menos 75 % o más, al menos 80 % o más, al menos 85 % o más, al menos 90 % o más, al menos 95 % o más, al menos 100 %, al menos 200 % o más, al menos 250 % o más, al menos 300 % o más, al menos 350 % o más, al menos 400 % o más, al menos 500 % o más, al menos 600 % o más, al menos 700 % o más, al menos 800 % o más, al menos 900 % o más, al menos 1000 % o más al menos 1500 % o más o al menos 2000 % o más de la actividad de estos.

En algunos ejemplos, A puede comprender cualquiera o más de las secuencias peptídicas establecidas en la SEQ ID NO. 14 - 35, o una de sus variantes siendo al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos al menos 90 %, al menos 95 % similar al mismo y que tenga al menos 10 % o más, al menos 15 % o más, al menos 20 % o más, al menos 25 % o más, al menos 30 % o más, al menos 35 % o más, al menos 40 % o más, al menos 45 % o más, al menos 50 % o más, al menos 55 % o más, al menos 60 % o más, al menos 65 % o más, al menos 70 % o más, al menos 75 % o más, al menos 80 % o más, al menos 85 % o más, al menos 90 % o más, al menos 95 % o más, al menos 100 %, al menos 200 % o más, al menos 250 % o más, al menos 300 % o más, al menos 350 % o más, al menos 400 % o más, al menos 500 % o más, al menos 600 % o más, al menos 700 % o más, al menos al menos 800 % o más, al menos 900 % o más, al menos 1000 % o más al menos 1500 % o más o al menos 2000 % o más de la actividad de estos.

800 % o más, al menos 900 % o más, al menos 1000 % o más al menos 1500 % o más o al menos 2000 % o más de la actividad de estos.

5 En un aspecto de la descripción, el péptido A de origen no natural puede comprender cualquiera o más de las secuencias peptídicas establecidas en la SEQ. ID. NO. 89 - 96, o una de sus variantes siendo al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % similar al mismo y que tenga al menos 10 % o más, al menos 15 % o más, al menos 20 % o más, al menos 25 % o más, al menos 30 % o más, al menos 35 % o más, al menos 40 % o más, al menos 45 % o más, al menos 50 % o más, al menos 55 % o más, al menos 60 % o más, al menos 65 % o más, al menos 70 % o más, al menos 75 % o más, al menos 80 % o más, al menos 85 % o más, al menos 90 % o más, al menos 95 % o más, al menos 100 %, al menos 200 % o más, al menos 250 % o más, al menos 300 % o más, al menos 350 % o más, al menos 400 % o más, al menos 500 % o más, al menos 600 % o más, al menos 700 % o más, al menos 800 % o más, al menos 900 % o más, al menos 1000 % o más al menos 1500 % o más o al menos 2000 % o más de la actividad de estos.

15 En un aspecto de la descripción, el péptido A de origen no natural puede comprender cualquiera o más de las secuencias peptídicas establecidas en la SEQ. ID. NO. 89, 92, 98, 103 o 106, o una de sus variantes siendo al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % similar al mismo y que tenga al menos 10 % o más, al menos 15 % o más, al menos 20 % o más, al menos 25 % o más, al menos 30 % o más, al menos 35 % o más, al menos 40 % o más, al menos 45 % o más, al menos 50 % o más, al menos 55 % o más, al menos 60 % o más, al menos 65 % o más, al menos 70 % o más, al menos 75 % o más, al menos 80 % o más, al menos 85 % o más, al menos 90 % o más, al menos 95 % o más, al menos 100 %, al menos al menos 200 % o más, al menos 250 % o más, al menos 300 % o más, al menos 350 % o más, al menos 400 % o más, al menos 500 % o más, al menos 600 % o más, al menos 700 % o más, al menos 800 % o más, al menos 900 % o más, al menos 1000 % o más al menos 1500 % o más o al menos 2000 % o más de la actividad de estos.

Agentes potenciadores de la transfección

30 Los complejos formados entre el péptido de origen no natural, el ácido nucleico y el agente de transfección pueden potenciar aún más mediante la inclusión de porciones tales como proteínas o péptidos que funcionan para la localización nuclear u otra localización subcelular, función para transporte o tráfico, son ligandos receptores, comprende señales adhesivas celulares, señales de direccionamiento celular, señales de internalización celular o señales de endocitosis, así como péptidos o porciones funcionales de estas de proteínas víricas fusogénicas de virus envueltos, de señales de localización nuclear viral, de ligandos receptores, de señales de adhesión celular, de señales dirigidas a células o de señales de internalización o endocitosis.

40 El complejo también puede contener opcionalmente un agente potenciador de la transfección, tal como una proteína o péptido de localización nuclear, un péptido o proteína fusogénica, péptido o proteína receptor-ligando, un péptido o proteína de transporte, o un péptido o proteína viral que es distinto en la secuencia de aminoácido de los péptidos de origen no natural de la presente descripción. El péptido viral adecuado puede derivarse de un virus tal como un virus de la gripe, un virus de estomatitis vesicular, un adenovirus, un alfavirus, un virus del bosque Semliki, un virus de la hepatitis, un virus del herpes, un virus del VIH, o un virus simio. El agente potenciador de la transfección también puede ser, por ejemplo, insulina, una transferrina, un factor de crecimiento epidérmico, un factor de crecimiento de fibroblastos, un anticuerpo dirigido a las células, una lactoferrina, una fibronectina, una base de penton de adenovirus, Knob, una proteína hexón, una glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular, una proteína de núcleo del virus del bosque Semliki, una hemaglutinina de la gripe, una proteína de núcleo de la hepatitis B, una proteína Tat del VIH, una proteína VP22 del virus del herpes simple, una proteína histona, una proteína de permeabilidad celular rica en arginina, una proteína de grupo de alta movilidad, y la proteína invasina, y la proteína internalina, una endotoxina, una toxina de la difteria, una toxina shigella, una melitina, una magainina, una gramicidina, una cecrofina, una defensina, una protegrina, una taquiplesina, una tionina, una indolicidina, una batenecina, una drosomicina, una apidaecina, una catelicidina, una proteína que aumenta la permeabilidad bactericida, una nisina, una buforina o fragmentos de estas. El agente potenciador de la transfección puede ser cloroquina, un compuesto lisosomotrófico o cualquier derivado, variantes, o sus combinaciones. El agente de transfección puede contener multímeros de los mismos o diferentes péptidos o proteínas.

50 Las proteínas o péptidos (o fragmentos o porciones de estos) de la descripción pueden usarse de acuerdo con esta descripción, individualmente o en combinación con otras proteínas o péptidos. En un aspecto preferido, se usan dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, etc. proteínas y/o péptidos en la descripción. Además, tales proteínas y/o péptidos sencillos o múltiples pueden usarse en combinación con uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, etc. agentes de transfección. En otro aspecto preferido, se usan al menos dos péptidos y/o proteínas en combinación con un agente de transfección, preferentemente al menos dos agentes de transfección tales como lípidos y/o policones tales como dendrímeros o PEI.

65 Otras modalidades de la presente invención se dirigen a complejos de transfección que contienen los péptidos de origen no natural descritos anteriormente en combinación con uno o más reactivos de transfección, cuyos reactivos

de transfección pueden incluir uno o más lípidos catiónicos, y opcionalmente uno o más lípidos auxiliares. En algunos ejemplos, un complejo de transfección puede incluir una carga que se suministra al interior de una célula, u opcionalmente puede administrarse a un animal o a un paciente humano que se beneficiaría de la administración de este. Las moléculas de carga preferidas, aunque no limitantes adecuadas para usar con la presente invención incluyen moléculas de ácido nucleico tales como moléculas de ADN o moléculas de ARN. Las moléculas de ADN adecuadas pueden incluir una molécula de ADN que tiene una secuencia de ácido nucleico expresable, tal como un vector de expresión o una molécula de ADNc que comprende un marco de lectura abierto que codifica una proteína. Otras moléculas adecuadas que pueden funcionar como carga adecuada en la práctica de la presente invención incluyen moléculas de ARN, tales como una molécula de ARNm o una molécula de ARNi.

Métodos para preparar péptidos:

Los péptidos de origen no natural de la presente invención pueden producirse mediante cualquier método de síntesis de péptidos previamente conocido por aquellos que poseen un nivel de habilidad ordinario en la técnica, sin limitación, que incluyen los métodos recombinantes o la química de síntesis de péptidos, tales como, por ejemplo, síntesis de péptido en fase sólida. El método de síntesis en fase sólida (Marrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, 2149-2154, 1963) puede observarse simplemente como un ejemplo de dicho método de síntesis de péptidos. En la actualidad, el péptido puede producirse de manera simple y en un período de tiempo relativamente corto mediante el uso de un sintetizador de péptidos de propósito general, automatizado basado en esos principios. Además, el péptido puede producirse mediante el uso de técnicas de producción de proteínas recombinantes bien conocidas, cuyas técnicas se conocen ampliamente por los expertos en la técnica.

Reactivos de transfección

La presente descripción también proporciona un complejo de transfección que comprende, en asociación no covalente, un péptido de origen no natural de acuerdo con la presente descripción como se describió anteriormente e incorpora en la presente descripción, al menos una molécula de carga como se definió anteriormente e incorpora en la presente descripción, al menos un reactivo de transfección como se definió anteriormente y se incorpora en la presente descripción.

En ciertas modalidades preferidas, aunque no limitantes, un reactivo de transfección seleccionado para uso en la práctica de la presente invención puede incluir uno o más lípidos catiónicos. En algunas modalidades, uno o más lípidos catiónicos pueden incluir opcionalmente al menos uno, opcionalmente más de un lípido neutro o lípido auxiliar.

En algunos ejemplos, un reactivo de transfección puede incluir uno o más lípidos, de los cuales uno o más pueden ser lípidos catiónicos. En algunas modalidades, el reactivo de transfección puede incluir una mezcla de lípidos neutros y catiónicos. En algunos ejemplos, el reactivo de transfección puede incluir uno o más péptidos y/o proteínas que son distintos del péptido de origen no natural de la presente descripción y que pueden proporcionarse solos o en mezcla con uno o más lípidos. A modo de ejemplo no limitante, uno de tales péptidos puede incluir un reactivo tal como, por ejemplo, el reactivo PLUS™ (Life Technologies, Carlsbad, CA). En algunas modalidades preferidas, el reactivo de transfección forma un complejo no covalente con la macromolécula/carga que se entrega al interior de la célula, los péptidos de origen no natural de la presente invención, y opcionalmente uno o más lípidos auxiliares o neutros. En modalidades preferidas, los complejos de transfección realizados de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción pueden tener una carga neta positiva, facilitando de ese modo la interacción del complejo de transfección con la membrana celular.

En algunos ejemplos, un reactivo de transfección adecuado para su uso de acuerdo con la presente descripción puede ser cualquier material, formulación o composición conocida por los expertos en la técnica que facilite la entrada de una macromolécula en una célula. En algunos ejemplos, el reactivo de transfección puede ser cualquier compuesto y/o composición que aumente la absorción de uno o más ácidos nucleicos u otras moléculas de carga en una o más células objetivo.

Los expertos en la técnica conocen una variedad de reactivos de transfección. Los reactivos de transfección adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, uno o más compuestos y/o composiciones que comprenden polímeros catiónicos tales como polietilenimina (PEI), polímeros de aminoácidos cargados positivamente tales como polilisina y poliarginina, dendrímeros cargados positivamente y dendrímeros fracturados, polímeros que contienen β-ciclodextrina catiónicos (polímeros CD), DEAE-dextrano y similares. En algunos ejemplos, un reactivo para la introducción de macromoléculas en las células puede comprender uno o más lípidos que pueden ser lípidos catiónicos y/o lípidos neutros. Los lípidos preferidos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), dioleoilfosfatidilcolina (DOPE), 1,2-Bis(oleoiloxi)-3-(4'-trimetilamonio)propano (DOTAP), 1,2-dioleoil-3-(4'-trimetilamonio)butanoil-sn-glicerol (DOTB), éster de 1,2-dioleoil-3-succinil-sn-glicerol colina (DOSC), butanoato de colesterilo (4'-trimetilamonio) (ChoTB), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), bromuro de 1,2-dioleoil-3-dimetilhidroxietilamonio (DORI), bromuro de 1,2-dioleoilpropil-3-dimetil hidroxietilamonio (DORIE), bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio (DMRIE), cloruro de O,O'-didodecil-N-[p(2-trimetilamonioetiloxi)benzoil]-N,N,N-trimetilamonio, espermina conjugada con uno o más lípidos (por ejemplo, 5-carboxiespermilglicina dioctadecilamida (DOGS), N,N^I,N^{II},N^{III}-tetrametil-N,N^I,N^{II},N^{III}-tetrapalmitilespermina (TM-TPS) y

dipalmitoilfosfatidiletanolamina 5-carboxiespermilamida (DPPES)), lipopolilisina (polilisina conjugada con DOPE), TRIS (Tris (hidroximetil)aminometano, trometamina) ácidos grasos conjugados (TFA) y/o péptidos tales como trilisil-alanil-TRIS mono-, di- y tri-palmitato, (3p-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol (DC-Chol), cloruro de N-(a-trimetilamonioacetil)-didodecil-D-glutamato (TMAG), bromuro de dimetil dioctadecilamonio (DDAB), 2,3-dioleoxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanamin-iniumtrifluoroacetato (DOSPA) y sus combinaciones.

Los expertos en la técnica apreciarán que se ha demostrado que ciertas combinaciones de los lípidos mencionados anteriormente son particularmente adecuadas para la introducción de ácidos nucleicos en las células, por ejemplo, una combinación 3:1 (p/p) de DOSPA y DOPE está disponible en Life Technologies Corporation, Carlsbad, California bajo el nombre comercial LIPOFECTAMINE™, una combinación 1:1 (p/p) de DOTMA y DOPE está disponible en Life Technologies Corporation, Carlsbad, California bajo el nombre comercial LIPOFECTIN®, una combinación (M/M) 1:1 de DMRIE y colesterol está disponible en Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, bajo el nombre comercial de reactivo DMRIE-C, una combinación 1:1,5 (M/M) de TM-TPS y DOPE está disponible en Life Technologies Corporation, Carlsbad, California bajo el nombre comercial CELLFECTIN® y una combinación 1:2,5 (p/p) de DDAB y DOPE está disponible en Life Technologies Corporation, Carlsbad, California bajo el nombre comercial LIPOFECTACE®. Además de las combinaciones de lípidos mencionadas anteriormente, los expertos en la técnica conocen otras formulaciones que comprenden lípidos en mezcla con otros compuestos, particularmente, en mezcla con péptidos y proteínas que comprenden secuencias de localización nuclear. Por ejemplo, ver la solicitud internacional núm. PCT/US99/26825, publicado como documento núm. WO 00/27795.

Se ha encontrado que los agregados lipídicos tales como los liposomas son útiles como agentes para el suministro de macromoléculas a las células. Particularmente, se ha demostrado que los agregados lipídicos que comprenden uno o más lípidos catiónicos son extremadamente eficaces en el suministro de macromoléculas aniónicas (por ejemplo, ácidos nucleicos) a las células. Un lípido catiónico de uso común es el cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA). Los liposomas que comprenden DOTMA solo o como una mezcla 1:1 con dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) se han usado para introducir ácidos nucleicos en las células. Una mezcla 1:1 de DOTMA:DOPE está disponible en el comercio en Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, bajo el nombre comercial de LIPOFECTIN™. Otro lípido catiónico que se ha usado para introducir ácidos nucleicos en las células es el 1,2-bis(oleoil-oxi)-3-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP). DOTAP se diferencia de DOTMA en que las porciones oleoil se enlazan a la cadena principal de propilamina a través de enlaces de éter en DOTAP, mientras que se enlazan a través de enlaces éster en DOTMA. Se cree que DOTAP se degrada más fácilmente por las células objetivo. Un grupo estructuralmente relacionado de compuestos en donde uno de los grupos metilo de la porción trimetilamonio se reemplaza con un grupo hidroxietilo tiene una estructura similar al inhibidor de Rosenthal (RI) de la fosfolipasa A (ver Rosenthal, y otros, (1960) J. Biol. Chem. 233: 2202-2206.). El RI tiene ésteres estearoilicos enlazados al núcleo de propilamina. Los análogos de dioleoil de RI se abrevian comúnmente como DOR1-éter y DOR1-éster, dependiendo del enlace de la porción lipídica con el núcleo de propilamina. El grupo hidroxilo de la porción hidroxietilo puede derivatizarse adicionalmente, por ejemplo, por esterificación a carboxiespermina.

Otra clase de compuestos que se ha usado para la introducción de macromoléculas en las células comprende una porción de carboxiespermina unida a un lípido (ver, Behr, y otros, (1989) Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 86: 6982-6986 y documento núm. EPO 0 394 111). Los ejemplos de compuestos de este tipo incluyen dipalmitoilfosfatidiletanolamina 5-carboxiespermilamida (DPPES) y 5-carboxiespermilglicina dioctadecilamida (DOGS). DOGS está disponible comercialmente en PROMEGA™, Madison, Wisconsin, bajo el nombre comercial de TRANSFECTAM™.

Un derivado catiónico de colesterol (30-[N--(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil] colesterol, DC-Col) se ha sintetizado y formulado en liposomas con DOPE (ver Gao, y otros, (1991) BBRC 179(1):280-285.) y se usa para introducir ADN en las células. Se informó que los liposomas así formulados introducen eficientemente ADN en las células con un bajo nivel de toxicidad celular. Se ha informado que la lipopolilisina, formada al conjugar la polilisina con DOPE (ver Zhou, y otros, (1991) BBA 1065: 8-14), es efectiva para introducir ácidos nucleicos en las células en presencia de suero.

Otros tipos de lípidos catiónicos que se han usado para introducir ácidos nucleicos en las células incluyen lípidos de amonio policatiónico, sulfonio y fosfonio altamente empaquetados, tal como los descritos en la patente de Estados Unidos núms. 5,674,908 y 5,834,439, y la solicitud internacional núm. PCT/US99/26825, publicado como documento núm. WO 00/27795.

Un reactivo de transfección no limitante para el suministro de macromoléculas de acuerdo con la presente descripción es el LIPOFECTAMINE 2000™ o derivados de este que está disponible en Life Technologies (ver la solicitud internacional de patente de los Estados Unidos núm. PCT/US99/26825, publicada como documento núm. WO 00/27795).

Otro reactivo de transfección preferido, aunque no limitante, adecuado para el suministro de macromoléculas a una célula es EXPIFECTAMINE™ o sus derivados.

Otros reactivos de transfección adecuados incluyen LIPOFECTAMINE® RNAiMAX, LIPOFECTAMINE® LTX, OLIGO-FECTAMINE® CELLFECTIN™, INVIVOFECTAMINE®, INVIVOFECTAMINE® 2.0 y cualquiera de los reactivos

lipídicos o formulaciones descritos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2012/0136073, de Yang y otros. El experto en la técnica conoce una variedad de otros reactivos de transfección y se puede evaluar su idoneidad para los sistemas y métodos de transfección transitorios descritos en la presente descripción.

5 A continuación, se describirán con mayor detalle diversos lípidos catiónicos preferidos, aunque no limitantes, y reactivo de transfección adecuados para usar con la presente descripción. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la descripción explícita de uno o más lípidos catiónicos específicos, o uno o más géneros de lípidos catiónicos, no pretende impedir el uso de otros reactivos o lípidos que puedan usarse junto con los péptidos de origen no natural de la presente descripción, y que la selección de lípidos catiónicos alternativos o reactivos de transfecciones, y el uso de
10 estos en el contexto de la presente descripción, está dentro del alcance del experto en la técnica, y que tal persona puede fácilmente usar dicho reactivo sin apartarse del espíritu y el alcance de la presente descripción.

Algunas modalidades de la presente descripción proporcionan agregados lipídicos que comprenden uno o más péptidos de origen no natural descritos anteriormente en combinación con uno o más lípidos catiónicos. Sin estar limitado o unido por ninguna teoría o explicación mecanicista para el rendimiento de la composición que forma la base de la presente descripción, y únicamente con el interés de proporcionar una descripción completa de esta, se cree que los péptidos de la presente descripción son de origen no natural, cuando se usa en combinación con uno o más reactivos de transfección, en particular con uno o más lípidos de transfección catiónicos, mejora la capacidad de un complejo de transfección que comprende un agregado lipídico y la molécula de carga para suministrarse en el interior de una célula. El uso de lípidos catiónicos, opcionalmente junto con uno o más lípidos auxiliares o uno o más lípidos neutros, puede permitir una mayor encapsulación de la molécula de carga por el agregado lipídico y además puede ayudar a la fusión del agregado lipídico liposomal con la membrana celular objetivo, mejorando de este modo el suministro de la molécula de carga.

25 Los lípidos catiónicos útiles para usar en la formación de complejos de transfección de la presente invención pueden ser lípidos catiónicos monovalentes o polivalentes o una mezcla de lípidos catiónicos. De particular interés son los lípidos catiónicos reconocidos en la técnica como útiles en los métodos de transfección, que incluyen, entre otros, DOTMA, DOTAP, DDAB, DMRIE, DOSPA, DOSPER, TMTPS, DHMS, DHDMS y sus análogos u homólogos. Opcionalmente, el agregado lipídico puede comprender además al menos un lípido auxiliar adicional. Los lípidos auxiliares son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, lípidos neutros, preferentemente seleccionados del grupo que consiste en DOPE, DOPC y colesterol. Opcionalmente, los complejos de transfección de la presente invención pueden incluir reactivos de transfección comercialmente disponibles que contienen lípidos catiónicos tales como Lipofectin®, LIPOFECTAMINE™ RNAiMAX y LIPOFECTAMINE™ 2000, LIPOFECTAMINE® 3000, LIPOFECTAMINE® LTX (Life Technologies Corporation, Carlsbad, California).

35 Una modalidad adicional de la descripción proporciona un agregado lipídico catiónico, que comprende uno o más lípidos catiónicos, opcionalmente uno o más lípidos auxiliares, y una o más moléculas de carga en complejo con uno o más de los péptidos no naturales descritos anteriormente. La molécula de carga puede ser cualquier sustancia que se transporte al interior de una célula, ya sea en cultivo en un laboratorio o en un tejido en un animal o un ser humano. La carga puede ser, según la aplicación, una macromolécula como un ácido nucleico, una proteína o un péptido, o puede ser un fármaco u otra molécula pequeña orgánica. En algunas modalidades, la carga preferida para formar un complejo de transfección es un ácido nucleico tal como, por ejemplo, ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). En algunas modalidades, la carga preferida puede ser una molécula de ADN. El ADN puede ser ADN lineal o ADN circular, tal como el ADN en forma de un plásmido circular, un episoma o un vector de expresión. En ciertos ejemplos preferidos, aunque no limitantes, el término macromolécula se refiere a ADN complementario (ADNc) que tiene una secuencia de ácido nucleico expresable, que incluye al menos un marco de lectura abierto operativamente unido a una o más secuencias de ácido nucleico requeridas para la transcripción de un ARNm de la secuencia de ácido nucleico expresable. En otras modalidades, una carga preferida puede ser una molécula de ARN. La molécula de ARN puede ser cualquier tipo de molécula de ARN, sin limitación, que incluye, entre otros, un ARNm, un ARNip, un ARNmi, un ARN antisentido, una ribozima o cualquier otro tipo o especie de molécula de ARN familiar para los expertos en la técnica sin limitación, que se podrían suministrar al interior de una célula.

Preferentemente, el complejo de transfección de la presente descripción puede incluir un péptido de origen no natural como se describe anteriormente, al menos una carga, al menos un lípido catiónico, y opcionalmente al menos un lípido auxiliar. El complejo de transfección, uno formado, es estable en solución acuosa y puede ponerse en contacto ya sea con una célula o un tejido en un humano o un animal inmediatamente después de formarse, o puede almacenarse durante un período antes de ponerse en contacto con la célula o el tejido. El complejo de transfección es estable y puede almacenarse durante un período de tiempo de al menos 30 minutos, al menos 45 minutos, al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 3 horas, al menos 4 horas, al menos 5 horas, a al menos 10 horas, al menos 15 horas, al menos 20 horas, al menos 24 horas, al menos 48 horas, al menos 72 horas, al menos 5 días, al menos 7 días, al menos 14 días, al menos 28 días, al menos al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses o al menos 1 año. Se entiende que el período de almacenamiento puede ser entre cualquiera de estos períodos de tiempo, por ejemplo, entre 31 minutos y 1 hora o entre 1 hora y 24 horas.

65 Generalmente, los complejos de transfección de esta invención pueden comprender cualquier lípido catiónico, ya sea monovalente o polivalente, que incluyen aquellos en reactivos de transfección conocidos (ver Tabla 5). Los lípidos

catiónicos incluyen éteres alquílicos y alicíclicos saturados e insaturados y ésteres de aminas, amidas o derivados de estos. Los grupos alquilo y alqueno de cadena recta y ramificada de lípidos catiónicos pueden contener de 1 a aproximadamente 25 átomos de carbono. Los grupos alquilo o alqueno de cadena lineal o ramificada preferidos tienen seis o más átomos de carbono. Los grupos alquilo o alqueno de cadena lineal o ramificada con mayor preferencia tienen de ocho a aproximadamente veinte átomos de carbono. Los grupos alicíclicos pueden contener de aproximadamente 6 a 30 átomos de carbono, y con mayor preferencia de ocho a veinte átomos de carbono. Los grupos alicíclicos preferidos incluyen colesterol y otros grupos esteroides. Los lípidos catiónicos se pueden preparar con una variedad de contraiones (aniones) que incluyen entre otros: Cl⁻, Br⁻, I⁻, F⁻, acetato, trifluoroacetato, sulfato, nitrito, triflato y nitrato.

En los agregados lipídicos de esta descripción, los lípidos catiónicos se pueden combinar opcionalmente con lípidos no catiónicos, preferentemente lípidos neutros, para formar agregados lipídicos que se unen al complejo de péptido modificado-ácido nucleico. Los lípidos neutros útiles en esta invención como lípidos auxiliares incluyen, entre muchos otros: lecitinas (y sus derivados); fosfotidiletanolamina (y sus derivados); fosfatidiletanolaminas, tal como DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina), DphPE (difitanoilfosfatidiletanolamina), DPPE (dipalmitoilfosfatidiletanolamina), dipalmitoilfosfatidiletanolamina, POPE (palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina) y diestearoil-fosfatidiletanolamina; fosfatidilcolina; fosfatidilcolinas, tal como DOPC (dioleoilfosfatidilcolina), DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) POPC (línea palmitoiloleoilfosfatidilcolina) y diestearoilfosfatidilcolina; fosfatidil-glicerol; fosfatidilgliceroles, tales como DOPG (dioleoilfosfatidilglicerol), DPPG (dipalmitoilfosfatidilglicerol) y diestearoilfosfatidilglicerol; fosfatidilserina (y sus derivados); fosfatidilserinas, tales como dioleoil- o dipalmitoilfosfatidilserina; difosfatidilgliceroles; ésteres de ácidos grasos; ésteres de glicerol; esfingolípidos; cardolipina; cerebrósidos; y ceramidas; y sus mezclas. Los lípidos neutros también incluyen colesterol y otros esteroides 3βOH, así como derivados de estos.

Los siguientes documentos de patente, solicitudes de patente o referencias describen los agentes de transfección que contienen lípidos catiónicos y neutros (auxiliares) que pueden usarse para comprender los agregados lipídicos de la presente descripción junto con los lípidos catiónicos: patentes de los Estados Unidos núms. 6,075,012; 6,020,202; 5,578,475; 5,736,392; 6,051,429; 6,376,248; 5,334,761; 5,316,948; 5,674,908; 5,834,439; 6,110,916; 6,399,663; 6,716,882; 5,627,159; PCT/US/2004/000430, publicado como documento núm. WO 04063342 A2; PCT/US/9926825, publicado como documento núm. WO 0027795 A1; PCT/US/04016406, publicado como documento núm. WO 04105697; y PCT/US2006/019356, publicado como documento núm. WO 07130073 A2. La Tabla 5 también enumera los agentes de transfección que comprenden lípidos catiónicos y lípidos neutros que pueden usarse para comprender los agregados lipídicos de la presente descripción junto con los lípidos catiónicos.

Tabla 5. Ejemplos no limitantes de reactivos de transfección

Agente de transfección	Descripción	Patentes y/o referencias	Disponible de
BMOP	Bromuro de N-(2-bromoetil)-N,N-dimetil-2,3-bis(9-octadeceniloxi)-propana minio)		
BMOP:DOPE	Formulación 1:1 (p/p) de bromuro de N-(2-bromoetil)-N,N-dimetil-2,3-bis(9-octadeceniloxi)-propano minio) (BMOP) y DOPE	Walzem y otros, Poult Sci. 76: 882-886, 1997. Transfection of avian LMH-2A hepatoma cells with cationic lipids.	
Polisacáridos catiónicos	Polisacáridos catiónicos	Solicitud de patente de Estados Unidos publicada 2002/0146826	
CellFECTIN®	Formulación 1:1,5 (M/M) de N, NI, NII, NIII-tetrametil-N, NI, NII, NIII-tetrapalmitilespermina (TM-TPS) y dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE)	Patentes de Estados Unidos núms. 5.674.908, 5.834.439 y 6.110.916	Invitrogen
CTAB:DOPE	formulación de bromuro de cetiltrimetilamonio (CATB) y dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE)		
Citofectina GSV	Formulación 2:1 (M/M) de citofectina GS* y dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE)		(*Citofectina GS corresponde a GS 3815 de Gilead Sciences)
DC-Colesterol (DC-Chol)	3,β-N,(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol		
DC-Chol:DOPE	formulación de 3,β-N,(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamo-il]colesterol (DC-Chol) y dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE)	Gao y otros, Biochim. Biophys. Res. Com. 179:280-285, 1991	

Continuación

	Agente de transfección	Descripción	Patentes y/o referencias	Disponible de
5	DC-6-14	Cloruro de O,O'-Ditetradecanoil-N-(alfa-trimetilammonioacetil) dietanolamina	Kikuchi y otros, Hum Gene Ther 10:947-955, 1999. Development of novel cationic liposomes for efficient gene transfer into peritoneal disseminated tumor.	
10	DCPE	Dicaproilfosfidiletanolamina		
15	DDPES	Dipalmitoilfosfatidiletanolamina carboxiespermidina	Behr y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6982-6986, 1989. Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA; solicitud de patente publicada EPO 0 394 111	
20	DDAB	bromuro de didoecilmetilamonio		
25	Dextrano y derivados conjugados de dextrano	DEAE-Dextrano; Sulfato de dextrano	Mai y otros, J Biol Chem. 277:30208-30218, 2002. Efficiency of protein transduction is cell type-dependent and is enhanced by dextran sulfate.	
30	Sales de amonio dicuaternario	(ejemplos © N,N'-dioleil-N,N,N,N'-tetrametil-1,2-etanodiamina (TmedEce), N,N'-dioleil-N,N,N,N'-tetrametil-1,3-propanodiamina (PropEce), N,N'-dioleil-N,N,N,N'-tetrametil-1,6-hexanediamina (HexEce) y sus análogos saturados de N,N'-dicetilo (TmedAce, PropAce y HexAce) correspondientes	Rosenzweig y otros, Bioconjug Chem 12:258-263, 2001. Diquateryary ammonium compounds as transfection agents; Patente de Estados Unidos núm. 5.994.317	Vical
35	DLRIE	bromuro de dilauriloxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio	Felgner y otros, Ann NY Acad Sci 772:126-139, 1995. Improved cationic lipid formulations for in vivo gene therapy.	Vical
40	DMAP	4-dimetilaminopiridina		
	DMPE	Dimiristoilfosfatidiletanolamina		
45	DMRIE	Bromuro de N-[1-(2,3 dimiristiloxi)propil]-N,N-dimetil-N-(2-hidroxietil) amonio	Konopka y otros, Biochim Biophys Acta 1312:186-96, 1996. Huma50mmunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes.	
50	DMRIE-C	Formulación 1:1 de bromuro de N-[1-(2,3-dimiristiloxi) propil]-N,N-dimetil-N-(2-hidroxietil) amonio (DMRIE) y colesterol	Patentes de Estados Unidos núms. 5.459.127 y 5.264.618 de Felgner y otros, (Vical)	Invitrogen
55	DMRIE:DOPE	formulación de bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxietil-amonio y dioleoilfosfatidil-etanolamina (DOPE)	San y otros, Hum Gene Ther 4: 781-788, 1993. Safety and short-term toxicity of a novel cationic lipid formulation for human gene therapy.	
	DOEPC	Dioleoiletilfosfocolina		
60	DOHME	Yoduro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N-[1-(2-hidroxietil)]-N,N-dimetilamonio		
	DOPC	Línea de dioleoilfosfatidilco		
	DOPC:DOPS	Formulación 1:1 (% en peso) de DOPC (línea de dioleoilfosfatidilco) y DOPS		Avanti

65

Continuación

Agente de transfección	Descripción	Patentes y/o referencias	Disponible de
DOSPA	2,3-dioleoiloxi-Trifluoroacetato de N-[2-(esperminacarboxamidoetil)-N,N-dimetil-1-propanaminio		
DOSPA:DOPE	Formulación de trifluoroacetato de 2,3-dioleoiloxi-N-[2-(esperminacarboxamidoetil)-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA) y dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE)	Baccaglini y otros, J Gene Med 3:82-90, 2001. Cationic liposome-mediated gene transfer to rat salivary epithelial cells in vitro and in vivo.	
DOSPER	1,3-di-oleoiloxi-2-(6-carboxiespermil)-propilamida	Buchberger y otros, Biochemica 2:7-10, 1996. DOSPER liposomal transfection reagent: a reagent with unique transfection properties.	Roche
DOTAP	Metilsulfato de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio		
DOTMA	Cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio		
DPEPC	Dipalmitoiletilfosfatodilcolina		
Efecteno	(Formulación de lípidos no liposomales usada junto con un potenciador especial de condensación de ADN y un tampón optimizado)	Zellmer y otros, Histochem Cell Biol 115:41-47, 2001. Long-term expression of foreign genes in normal human epidermal keratinocytes after transfection with lipid/DNA complexes.	Qiagen
FuGENE® 6		Wiesenhofer y otros, J Neurosci Methods 92:145-152, 1999. Improved lipid-mediated gene transfer in C6 glioma cells and primary glial cells using FuGene.	Roche
GAP-DLRIE: DOPE	Bromuro de N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis (dodeciloxi)-1-propanaminio/dioleoilfosfatidiletanolamina	Stephan y otros, Hum Gene Ther 7:1803-1812, 1996. A new cationic liposome DNA complex enhances the efficiency of arterial gene transfer in vivo.	
Citofectina GS 2888		Lewis y otros, Proc Natl Acad Sci USA 93:3176-3181, 1996. A serum-resistant cytofectin for cellular delivery of antisense oligodeoxynucleotide s and plasmid DNA.	Gilead Sciences
Lipofectin®	Formulación 1:1 (p/p) de N-(1-2,3-dioleiloxipropil)-N,N,N-trietilamonio (DOTMA) y dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE)	Patentes de Estados Unidos núms. 4.897.355; 5.208.066; y 5.550.289.	Invitrogen
LipofectACE™	Formulación 1:2,5 (p/p) de bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB) y dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE)		Invitrogen
LIPOFECTAMINE® LTX		Patente de Estados Unidos núm. 7.915.230	Invitrogen

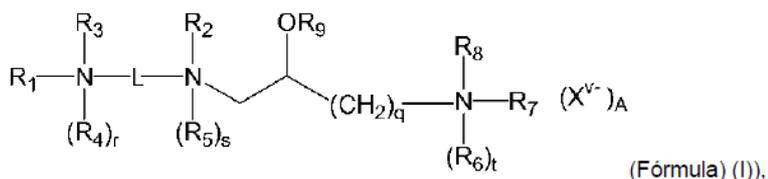
Continuación

Agente de transfección	Descripción	Patentes y/o referencias	Disponible de
LIPOFECTAMINE™	Formulación 3:1 (p/p) de trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanamino (DOSPA) y dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE)	Patente de Estados Unidos núm. 5.334.761; y las patentes de Estados Unidos núms. 5.459.127 y 5.264.618 de Felgner y otros, (Vical)	Invitrogen
LIPOFECTAMINE™ 2000			Invitrogen
LipofectAMINE PLUS™		Patentes de Estados Unidos núms. 5.736.392 y 6.051.429	Invitrogen
LIPOFECTAMINE® 3000			Invitrogen
LipoTAXI®			Stratagene
lípidos de transfección monocatiónica	(ejemplos:) 1-desoxi-1-[dihexadecil(metil)amonio]-D-xilitol; 1-desoxi-1-[metil(ditetradecil)amonio]-D-arabinitol; 1-desoxi-1-[dihexadecil(metil)amonio]-D-arabinitol; 1-desoxi-1-[metil(dioctadecil)amonio]-D-arabinitol	Banerjee y otros, J Med Chem 44:4176-4185, 2001. Design, synthesis, and transfection biology of novel cationic glycolipids for use in liposomal gene delivery.	
O-Chol	3 beta[1-ornitinamida-carbamoil] colesterol	Lee y otros, Gene Ther 9:859-866, 2002. Intraperitoneal gene delivery mediated by a novel cationic liposome in a peritoneal disseminated ovarian cancer model.	
OliofectAMINE™			Invitrogen
Lípidos catiónicos anfílicos a base de piperazina	Lípidos catiónicos anfílicos a base de piperazina	Patentes de Estados Unidos núms. 5.861.397 y 6.022.874	Vical
PolyFect	(moléculas de dendrímero activado con una arquitectura esférica definida)		Qiagen
Protamina	Mezcla de protamina preparada a partir de, por ejemplo, salmón, arenque salado, etc. se puede suministrar como, por ejemplo, un sulfato o fosfato.	Sorgi y otros, Gene Ther 4:961-968, 1997. Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer.	Sigma
SuperFect	(moléculas de dendrímero activado con una arquitectura esférica definida)	Tang y otros, Bioconjugate Chem. 7:703, 1996. In vitro gene delivery by degraded polyamido-amine dendrimers.; solicitudes PCT publicadas núms. WO 93/19768 y WO 95/02397	Qiagen
Tfx™	Yoduro de N,N,N',N'-tetrametil-N,N'-bis (2-hidroxietil)-2,3-di (oleoiloxi)-1,4-butanodiamonio] y DOPE		Promega
TransFast™	Yoduro de N,N [bis (2-hidroxietil)-N-metil-di (tetradecanoiloxi) propil] amonio y DOPE		Promega
TransfectAce			Invitrogen
TRANSFECTAM™	5-carboxilespermilglicina dioctadecilamida (DOGS)	Behr y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6982-6986, 1989; publicación de patente núm. EPO 0394111	Promega
TransMessenger	(formulación a base de lípidos que se usa junto con un potenciador de condensación de ARN específico y un tampón optimizado; particularmente útil para la transfección de ARNm)		Qiagen

Continuación

Agente de transfección	Descripción	Patentes y/o referencias	Disponible de
Vectamidina	3-tetradecilamino-N-terc-butil-N'-tetradecilpropionamidina (también conocido como diC14-amidina)	Ouahabi y otros, FEBS Lett 414:187-92, 1997. The role of endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids.	
X-tremeGENE™			Roche

En algunos ejemplos preferidos, aunque no limitantes, los agregados lipídicos pueden incluir al menos un primer lípido catiónico y opcionalmente al menos un primer lípido neutro, en donde dicho agregado lipídico es adecuado para formar un complejo catiónico con un ácido nucleico en condiciones acuosas, en donde dichos lípidos catiónicos tienen la estructura:



y sales de estos; donde:

R₁ y R₂, independientemente, son unos grupos alquilo, alquenoilo o alquinilo, que tienen de 8 a 30 átomos de carbono;

un grupo alquilo, alquenoilo o alquinilo, que tiene de 8 a 30 átomos de carbono y opcionalmente sustituido con uno o más de un grupo alcohol, un aminoalcohol, una amina, una amida, un éter, un poliéter, un éster, un mercaptano, alquiltio o un carbamoilo o donde R₁ es - (CH₂)_q-N(R₆)_tR₇R₈;

R₃ y R₄, independientemente, son hidrógenos, o grupos alquilo, alquenoilo o alquinilo que tienen de 8 a 30 átomos de carbono y opcionalmente sustituidos con uno o más de un alcohol, un aminoalcohol, una amina, una amida, un éter, un poliéter, un éster, un mercaptano, alquiltio o un grupo carbamoilo;

R₅-R₈, independientemente, son hidrógenos, o grupos alquilo, grupos alquenoilo o alquinilo;

R₉ es un hidrógeno, o un grupo alquilo, alquenoilo o alquinilo, un carbohidrato o un péptido;

r, s y t son 1 o 0 para indicar la presencia o ausencia del grupo R indicado, cuando cualquiera de r, s o t es 1, el nitrógeno al que se une el grupo R indicado está cargado positivamente y en donde al menos uno de r, s o t es 1; q es un número entero se encuentra en el intervalo de 1 a 6, inclusive;

X^{v-} es un anión, donde v es la valencia del anión y A es el número de aniones;

L es un radical orgánico divalente capaz de unir covalentemente los dos nitrógenos seleccionados entre:(CH₂)_n, donde n es un número entero que varía de 1 a 10, inclusive, que está opcionalmente sustituido con uno o más grupos ZR₁₀, donde Z es O u S, y R₁₀ es hidrógeno o un grupo alquilo, grupo alquenoilo o alquinilo; o

{-(CH₂)_k-Y-(CH₂)_m}_p-, donde k y m, independientemente, son enteros que varían de 1 a 10, inclusive, y p es un número entero que se encuentra en el intervalo de 1 al 6, inclusive, e Y es O, S, CO, COO, CONR₁₁, NR₁₁CO o NR₁₁COR₁₁N donde R₁₁, independiente de cualquier otro R₁₁, es hidrógeno o un grupo alquilo;

en donde uno o más grupos CH₂ de los grupos alquilo, alquenoilo o alquinilo de R₁-R₁₀ pueden reemplazarse con un O, S, SS, CO, COO, NR₁₂CO, NR₁₂COO, o NR₁₂CONR₁₂ donde R₁₂, independiente de cualquier otro R₁₂, es hidrógeno o un grupo alquilo, alquenoilo o alquinilo; y

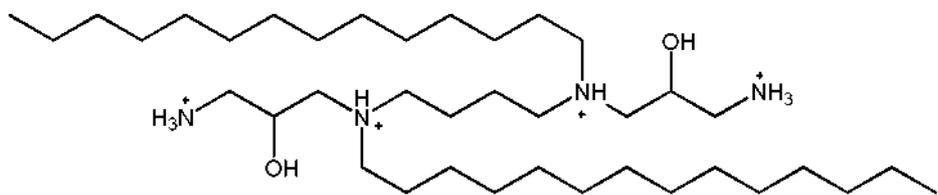
en donde los grupos alquilo, alquenoilo o alquinilo de R₁-R₁₂ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos OR₁₃, CN, halógenos, N(R₁₃)₂, péptido o carbohidrato donde R₁₃, independiente de otros R₁₃, es hidrógeno o un grupo alquilo, alquenoilo o alquinilo, y

en donde al menos uno de R₃ y R₄, cuando están presentes como grupos alquilo, están sustituidos con ambos grupos OR₁₃ y N(R₁₃)₂.

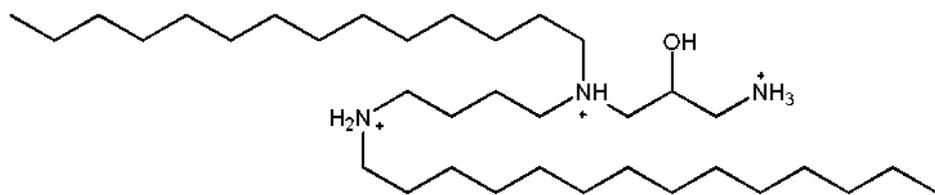
La síntesis de estos compuestos y métodos para la preparación de agregados lipídicos que los incorporan puede lograrse por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica sin limitación. Los métodos ilustrativos, aunque no limitantes, para sintetizar tales compuestos, y métodos para la formación de agregados lipídicos que los incorporan, se pueden encontrar, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos núm. 7,166,745 y la Publicación PCT núm. WO 00/27795.

En algunas modalidades, los agregados lipídicos que forman la base de la presente descripción pueden incluir adicionalmente opcionalmente uno, opcionalmente más de un lípido catiónico adicional seleccionado de la lista que consiste en TMTPS, DOGS, DPPES, DOTMA, DOTAP, DDAB, DMRIE, DOSPA, y DOSPER.

En algunas modalidades de los presentes agregados lipídicos, un lípido catiónico particularmente preferido, aunque no limitante usado en la formación de los complejos de transfección de la invención puede ser el tetrahidrocloruro de dihidroxil-dimiristilpermina (en lo sucesivo denominado como "DHDMS") que tiene la estructura:



En algunas modalidades de los presentes agregados lipídicos, un lípido catiónico particularmente preferido aunque no limitante usado en la formación de los complejos de transfección de la invención puede ser el tetrahidrocloruro de hidroxil-dimiristilpermina (en lo sucesivo denominado "HDMS") que tiene la estructura:



En algunas modalidades, los lípidos neutros pueden seleccionarse entre los siguientes; DOPE, colesterol o DOPC. En una modalidad, un lípido neutro puede ser uno de colesterol, DOPE o DOPC. En una modalidad, el lípido es colesterol. En una modalidad, un lípido neutro es DOPE. En una modalidad, un lípido es DOPC.

En una modalidad, el segundo lípido neutro opcional puede ser uno de colesterol, DOPE o DOPC, excepto que el segundo lípido neutro y el primer lípido neutro descritos anteriormente no son iguales. En una modalidad, el segundo lípido neutro opcional es el colesterol. En una modalidad, el segundo lípido neutro opcional es DOPE. En una modalidad, el segundo lípido neutro opcional es DOPC.

En algunas modalidades, la relación molar del lípido catiónico en el agregado lipídico puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,8. En algunas modalidades, la relación molar del lípido catiónico en el agregado lipídico puede estar entre 0,1 a aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,25, aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,25 a aproximadamente 0,35, aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,4, aproximadamente 0,35 a aproximadamente 0,45, aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,45 a aproximadamente 0,55, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 0,6, aproximadamente 0,55 a aproximadamente 0,65, aproximadamente 0,6 a aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,65 a aproximadamente 0,75, aproximadamente 0,7 a aproximadamente 0,8, o aproximadamente 0,75 a aproximadamente 0,85.

En algunas modalidades, la relación molar de DHDMS en el agregado lipídico puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,7. En algunas modalidades, la relación molar del lípido catiónico en el agregado lipídico puede ser de aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,25, aproximadamente 0,3 o aproximadamente 0,4, o cualquier intervalo que se encuentre entre ellos.

En algunas modalidades, la relación molar de DHDMS es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,4. En algunas modalidades, la relación molar de DHDMS es de aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,25, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,4, o cualquier intervalo que se encuentre entre ellos.

En algunas modalidades, la relación molar de HDMS en el agregado lipídico puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,4. En algunas modalidades, la relación molar del segundo lípido catiónico

en el agregado lipídico puede ser de aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,25, aproximadamente 0,3 o aproximadamente 0,4, o cualquier intervalo que se encuentre entre ellos.

5 En algunas modalidades, la relación molar de HDMS es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,4. En algunas modalidades, la relación molar de HDMS es de aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,25, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,4, o cualquier intervalo que se encuentre entre ellos.

10 En algunas modalidades, la relación molar del lípido neutro en el agregado lipídico puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,8. En algunas modalidades, la relación molar del lípido catiónico en el agregado lipídico puede estar entre 0,1 a aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,25, aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,25 a aproximadamente 0,35, aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,4, aproximadamente 0,35 a aproximadamente 0,45, aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,45 a aproximadamente 0,55, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 0,6, aproximadamente 0,55 a aproximadamente 0,65, aproximadamente 0,6 a aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,65 a aproximadamente 0,75, aproximadamente 0,7 a aproximadamente 0,8, o aproximadamente 0,75 a aproximadamente 0,85, o cualquier intervalo que se encuentre entre ellos.

20 En algunas modalidades, la relación molar de colesterol es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,8. En algunas modalidades, la relación molar del lípido catiónico en el agregado lipídico puede estar entre 0,1 a aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,25, aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,25 a aproximadamente 0,35, aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,4, aproximadamente 0,35 a aproximadamente 0,45, aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,45 a aproximadamente 0,55, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 0,6, aproximadamente 0,55 a aproximadamente 0,65, aproximadamente 0,6 a aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,65 a aproximadamente 0,75, aproximadamente 0,7 a aproximadamente 0,8, o aproximadamente 0,75 a aproximadamente 0,85, o cualquier intervalo que se encuentre entre ellos.

30 En algunas modalidades, la relación molar de DOPE es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,8. En algunas modalidades, la relación molar del lípido catiónico en el agregado lipídico puede estar entre 0,1 a aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,25, aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,25 a aproximadamente 0,35, aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,4, aproximadamente 0,35 a aproximadamente 0,45, aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,45 a aproximadamente 0,55, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 0,6, aproximadamente 0,55 a aproximadamente 0,65, aproximadamente 0,6 a aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,65 a aproximadamente 0,75, aproximadamente 0,7 a aproximadamente 0,8, o aproximadamente 0,75 a aproximadamente 0,85, o cualquier intervalo que se encuentre entre ellos.

40 En algunas modalidades, la relación molar de DOPC es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,4. En algunas modalidades, la relación molar de DOPC es de aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,25, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,4, o cualquier intervalo que se encuentre entre ellos.

45 En algunas modalidades, la relación molar de colesterol es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,8. En algunas modalidades, la relación molar de colesterol es de aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,25, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,35, aproximadamente 0,4, aproximadamente 0,45, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,55, aproximadamente 0,6, aproximadamente 0,65, aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,75, aproximadamente 0,8, o cualquier intervalo que se encuentre entre ellos.

50 En algunas modalidades, la relación molar de DOPE es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,8. En algunas modalidades, la relación molar de DOPE es de aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,25, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,35, aproximadamente 0,4, aproximadamente 0,45, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,55, aproximadamente 0,6, aproximadamente 0,65, aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,75, aproximadamente 0,8, o cualquier intervalo que se encuentre entre ellos.

55 En algunas modalidades, la relación molar de DOPC es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,8. En algunas modalidades, la relación molar de DOPC es de aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,25, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,35, aproximadamente 0,4, aproximadamente 0,45, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,55, aproximadamente 0,6, aproximadamente 0,65, aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,75, aproximadamente 0,8, o cualquier intervalo que se encuentre entre ellos.

60 En algunas modalidades, la relación molar de DHDMS es de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,4 o 0,5 y la relación molar del lípido neutro es de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,4 o 0,5.

65 En algunas modalidades, la relación molar de HDMS es de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,4 o 0,5 y la relación molar de lípido neutro es de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,4 o 0,5.

La composición de una variedad de formulaciones lipídicas de acuerdo con diversas modalidades no limitantes de la

descripción se proporciona en la Tabla I. La disposición de estas modalidades ilustrativas no pretende de ninguna manera limitar el alcance de la descripción únicamente a las formulaciones descritas. Por el contrario, simplemente pretende proporcionar una variedad de posibles formulaciones de agregados lipídicos que se pueden usar en la práctica de la presente descripción. Sin embargo, será evidente para un experto en la técnica que las formulaciones se pueden cambiar o alterar, y se pueden agregar componentes adicionales (tales como, por ejemplo, lípidos catiónicos o neutros adicionales, porciones de direccionamiento de péptidos y similares), o uno de los lípidos neutros mencionados en la Tabla I pueden eliminarse opcionalmente, y las formulaciones resultantes estarán dentro del espíritu y alcance de la descripción como se describe en la presente descripción.

10 Preparación y uso de complejos que contienen péptidos de origen no natural

Otra modalidad de la presente descripción proporciona un método para suministrar un polianión, tal como una molécula de ácido nucleico en una célula o células, en donde el método comprende formar un agregado lipídico, preferentemente un liposoma, que comprende uno o más lípidos catiónicos y uno o más lípidos neutros, poniendo en contacto el agregado lipídico con el polianión que ya ha formado complejo con el péptido de origen no natural de la presente descripción en virtud de la presencia de la región catiónica B en él, formando así un complejo de agregado lipídico-péptido-polianión neutro o cargado positivamente e incubando una célula o células con el complejo. Los aniones útiles incluyen proteínas, péptidos y ácidos nucleicos, preferentemente ADN o ARN. Preferentemente, el agregado lipídico comprende además al menos un lípido auxiliar adicional. Opcionalmente, el complejo agregado lipídico-polianión se almacena durante un período antes de ponerse en contacto con la célula o células. El complejo agregado lipídico-polianión es estable y puede almacenarse durante un período de tiempo de al menos 45 minutos, al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 3 horas, al menos 4 horas, al menos 5 horas, al menos 10 horas, al menos 15 horas, al menos 20 horas, al menos 24 horas, al menos 48 horas, al menos 72 horas, al menos 5 días, al menos 7 días, al menos 14 días, al menos 28 días, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses o al menos 1 año, o por un período de tiempo entre cualquiera de estos períodos de tiempo. Esta descripción es particularmente útil para administrar ARNi, que incluye ARNip, ARN de horquilla corta (ARNhc) y ARN pequeño regulado temporalmente (ARNtp), que opcionalmente se modifican químicamente.

Los métodos de la presente descripción implican poner en contacto cualquier célula, preferentemente una célula eucariota, con un complejo de transfección que comprende al menos un péptido de origen no natural, un agente de transfección y un ácido nucleico como se describió anteriormente. El complejo también puede opcionalmente contener uno o más péptidos o proteínas adicionales, tal como un péptido o proteína fusogénica, permeabilizante de membrana, transporte o tráfico de localización subcelular o ligando de receptor. Estos péptidos o proteínas adicionales se pueden conjugar opcionalmente con un grupo de unión a ácido nucleico, u opcionalmente conjugar con el agente de transfección (lípido o polímero policationico) donde el péptido o proteína o péptido o proteína modificada está asociado de manera no covalente con el ácido nucleico. Sin estar unidos por ninguna teoría, los solicitantes creen que los complejos de la presente descripción son agregados lipídicos que típicamente contienen estructuras de agregados lipídicos o liposomales, aunque actualmente no se conoce la naturaleza precisa de estas estructuras. Por consiguiente, en ciertos ejemplos ilustrativos, los complejos de la presente descripción son complejos liposomales. Todo el complejo, o una porción del complejo, como una porción de lípidos, por ejemplo, un lípido de Fórmula I se puede formular en liposomas, por ejemplo, mediante el uso del método de evaporación inversa, que es bien conocido en la técnica. Alternativamente, la porción lipídica del complejo o el complejo completo puede formularse por otros métodos bien conocidos para la formación de liposomas, tal como sonicación o microfluidización. Estas formulaciones de liposomas son efectivas para transfectar ADN en células cultivadas.

En un ejemplo, primero se forma un complejo que contiene el péptido o la proteína de origen no natural de la descripción y el ácido nucleico (donde el péptido o la proteína de origen no natural se puede conjugar opcionalmente con un grupo de unión de ácido nucleico) y luego se forma combinado con un lípido catiónico, como un lípido de Fórmula I, para la transfección. En un ejemplo relacionado, un conjugado de lípido-péptido o lípido-proteína se combina opcionalmente con otros lípidos, que incluyen cualquier lípido catiónico apropiado, y luego se combina con ácido nucleico para la transfección. En otro ejemplo relacionado, se forma un complejo ácido nucleico-lípido y luego se combina con un péptido o proteína de origen no natural para la transfección. Como se discutió anteriormente, los complejos que contienen lípidos de cualquiera de estos ejemplos pueden ser formulaciones liposomales o no liposomales. Además, cualquiera de los complejos formados en estos ejemplos puede almacenarse, por ejemplo, durante 5 minutos a 1 año, o durante 15 minutos a 6 meses, o durante 1 hora a 3 meses, antes de transfectar las células. En el caso de un conjugado lípido-péptido o proteína, dicho conjugado se puede almacenar, por ejemplo, durante 5 minutos a 1 año, o durante 15 minutos a 6 meses, o durante 1 hora a 3 meses, antes de combinar con ácido nucleico.

En otro ejemplo, se forma un complejo que contiene el péptido o proteína de origen no natural y el ácido nucleico (donde el péptido o proteína de origen no natural puede conjugarse con un grupo de unión de ácido nucleico) y luego se combina con un polímero policationico para transfección. En un ejemplo relacionado, un conjugado de péptido-polímero policationico se combina opcionalmente con otro polímero policationico y luego se combina con el ácido nucleico para la transfección. En otro ejemplo relacionado, se forma un complejo de ácido nucleico-polímero policationico y luego se combina con un péptido o proteína para la transfección. Un polímero policationico y/o un polímero policationico conjugado con péptido se puede combinar con los lípidos catiónicos y una composición de

lípidos catiónicos para obtener composiciones mejoradas para la transfección de ácido nucleico. De acuerdo con la descripción, se pueden agregar múltiples péptidos y/o proteínas para lograr la transfección.

5 Las composiciones para la transfección de esta descripción que comprenden conjugados de lípidos-péptidos o lípidos-proteínas y ácidos nucleicos pueden incluir además otros agentes no peptídicos o no proteicos que se sabe que potencian aún más la transfección.

10 Las composiciones para la transfección de esta descripción que comprenden conjugados de polímeros policatiónicos de proteínas o péptidos y ácido nucleico pueden incluir además otros agentes no peptídicos que se sabe que potencian aún más la transfección de polímeros policatiónicos, por ejemplo, la transfección de polímeros policatiónicos puede potenciarse mediante la adición de DEAE-dextrano y/o cloroquina.

15 En una modalidad preferida, aunque no limitante, el péptido de origen no natural de la presente descripción puede unirse primero por asociación no covalente a un ácido nucleico u otra carga para introducirse en una célula. Los complejos péptido-ácido nucleico se mezclan luego con un agente de transfección (o mezcla de agentes) y la mezcla resultante se emplea para transfectar células. Los agentes de transfección preferidos son composiciones de lípidos catiónicos, tales como, pero sin limitarse a, aquellos que contienen un lípido de Fórmula (I), particularmente composiciones de lípidos catiónicos monovalentes y polivalentes, más particularmente composiciones de lípidos catiónicos compuestos de mezclas 1:1 a 4:1 de lípidos catiónicos y DOPE y mezclas 1:1 a 4:1 de lípidos catiónicos y colesterol, así como mezclas 1:1 a 4:1 de lípidos catiónicos y DOPC, más particularmente composiciones de lípidos catiónicos compuestos de mezclas 1:1 a 4:1 de tetrahidrocloruro de dihidroxil-dimiristilispermina y DOPE y mezclas 1:1 a 4:1 de tetrahidrocloruro de dihidroxil-dimiristilispermina y DOPC, así como mezclas 1:1 a 4:1 de tetrahidrocloruro de hidroxildimiristilispermina y DOPE y una mezcla 1:1 a 4:1 de tetrahidrocloruro de hidroxil-dimiristilispermina y colesterol, así como una mezcla 1:1 a 4:1 de tetrahidrocloruro de hidroxil-dimiristilispermina y DOPC.

20 En otro ejemplo opcional, una mezcla de uno o más péptidos, proteínas o fragmentos de proteínas que mejoran la transfección, que incluyen péptidos o proteínas fusogénicas, péptidos o proteínas de transporte o tráfico, péptidos o proteínas receptor-ligando, o péptidos o proteínas de localización nuclear y/o sus análogos modificados (por ejemplo, péptidos o proteínas modificados con espermina) pueden formar complejos con ácido nucleico al mismo tiempo o inmediatamente después de la formación del complejo de ácido nucleico con el péptido de origen no natural de la presente descripción para introducirse en una célula. Los complejos de péptido-ácido nucleico se mezclan luego con el agente de transfección y la mezcla resultante se emplea para transfectar las células. En ciertos ejemplos, la mezcla del péptido, la proteína o el fragmento de proteína que mejora la transfección se almacena antes de formar un complejo con ácido nucleico.

25 En otro ejemplo opcional, un componente de un agente de transfección (lípidos, lípidos neutros, lípidos auxiliares, lípidos catiónicos, dendrímeros o PEI) se puede conjugar covalentemente a péptidos, proteínas o fragmentos de proteínas seleccionados directamente o mediante un grupo de unión o espaciador. De particular interés en este ejemplo son los péptidos o proteínas que son proteínas fusogénicas de origen no natural de virus sin envoltura, como se conocen en la técnica.

Usos ilustrativos de los complejos que contienen péptidos de origen no natural de virus sin envoltura

30 Los métodos de administración que emplean los agregados lipídicos de la presente descripción o sus mezclas se pueden aplicar a células in vitro, ex vivo e in vivo, particularmente para la transfección de células o tejidos eucariotas que incluyen células animales, células humanas, células animales no humanas, células de insectos, células de plantas, células de aves, células de peces, células de mamíferos y similares. El polianión que se va a suministrar a la célula se pone en contacto con los agregados lipídicos en presencia de un péptido de origen no natural como se describió anteriormente para formar un complejo agregado de polianión-lípido-polipéptido. La célula o células objetivo se incuban luego con el complejo o, para aplicaciones in vivo, el complejo se administra al organismo para que el complejo entre en contacto con las células o tejido objetivo. Los compuestos de la presente descripción también se pueden conjugar o mezclar con o usar junto con una variedad de moléculas y sustancias útiles, también denominadas auxiliares de la transfección, tales como proteínas, péptidos, factores de crecimiento y similares para mejorar la orientación celular, captación, internalización, focalización nuclear y expresión.

35 Los complejos y métodos de la presente descripción, especialmente aquellos que implican composiciones para la transfección que incluyen complejos proporcionados en la presente, se pueden usar para la transfección in vitro e in vivo de células, particularmente de células eucariotas, y más particularmente para la transfección de células eucariotas superiores, incluyendo células animales. Los métodos de esta descripción se pueden usar para generar células transfectadas que expresan productos génicos útiles. Los métodos de esta descripción también se pueden emplear como una etapa en la producción de animales transgénicos. Los métodos de esta descripción pueden ser útiles como una etapa en cualquier método terapéutico que requiera la introducción de ácidos nucleicos en las células, que incluyen los métodos de terapia génica e inhibición viral y para la introducción de ácidos nucleicos antisentido o antigénico, ribozimas, secuencias reguladoras de ARN, ARNip, ARNi, ARNi Stealth® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) o ácidos nucleicos inhibidores o reguladores relacionados en las células. En particular, estos métodos pueden ser

útiles en el tratamiento del cáncer, en terapia génica in vivo y ex vivo, y en métodos de diagnóstico.

Las composiciones y métodos para la transfección de esta descripción que comprenden péptidos, proteínas, fragmentos de péptidos o proteínas o péptidos modificados o proteínas modificadas, también se pueden emplear como agentes de investigación en cualquier transfección de células eucariotas realizada con fines de investigación.

Por consiguiente, en la presente descripción se proporciona un método para introducir una macromolécula en una célula, que incluye formar una composición para la transfección que incluye un ácido nucleico y un complejo que comprende un agente de transfección y un agente de fusión, en donde el agente de fusión incluye una secuencia de aminoácidos que promueve la fusión derivada de una proteína de fusión de un virus sin envoltura; y poner en contacto una célula eucariota con la composición para la transfección. En la sección de ejemplos de la presente descripción se proporcionan protocolos ilustrativos para usar composiciones de la presente invención para transfectar células eucariotas. Como se describe en la presente descripción, el agente de fusión en ejemplos ilustrativos es un péptido de fusión de membrana (MPP), ventajosamente un péptido de fusión que tiene una longitud de entre 5 y 50 aminoácidos, donde al menos 5 aminoácidos contiguos del péptido de fusión tienen al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 % similares a cualquiera de los péptidos que se muestran en la Tabla 1.

Un ejemplo adicional proporciona un método para transfectar una célula o tejido con un ácido nucleico in vivo en donde el método comprende formar un agregado lipídico, preferentemente un liposoma, que comprende uno o más lípidos catiónicos, opcionalmente uno o más lípidos neutros y opcionalmente uno o más auxiliares lípidos, que ponen en contacto el agregado lipídico con el complejo ácido nucleico-péptido formado al poner en contacto el ácido nucleico con un péptido de origen no natural de la presente descripción en condiciones suficientes para promover la interacción estable no covalente entre el péptido y el ácido nucleico, formando así un complejo de ácido nucleico-agregado lipídico neutro o cargado positivamente y administrando el complejo de ácido nucleico-agregado lipídico al organismo para que el complejo entre en contacto con las células o tejidos objetivo.

La administración del complejo de agregado lipídico-péptido-ácido nucleico se puede lograr por vía oral, intravenosa o por inyección subcutánea o intramuscular o se puede aplicar tópicamente al tejido o a las células en cultivo en un entorno de laboratorio.

Opcionalmente, el complejo de polianión-péptido-agregado lipídico se almacena durante un período antes de ponerse en contacto con la célula o células para la transfección. El complejo de polianión-péptido-agregado lipídico es estable y puede almacenarse durante un período de tiempo de al menos 30 minutos, al menos 45 minutos, al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 3 horas, al menos 4 horas, a al menos 5 horas, al menos 10 horas, al menos 15 horas, al menos 20 horas, al menos 24 horas, al menos 48 horas, al menos 72 horas, al menos 5 días, al menos 7 días, al menos 14 días, al menos al menos 28 días, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses o al menos 1 año, o por un período de tiempo entre cualquiera de estos períodos.

En otro ejemplo, los agregados lipídicos de la presente descripción (aproximadamente entre 1 ml y 2000 ml) se proporcionan en los pocillos de una placa de pocillos múltiples. Las moléculas de polianión objetivo que se suministran a las células objetivo se seleccionan y se añaden a los pocillos para formar complejos agregado lipídico-péptido-polianión, que posteriormente se ponen en contacto con las células objetivo. Los agregados lipídicos pueden tener la misma composición y concentración en cada pocillo, o la composición y/o concentración de agregados lipídicos puede variar de pocillo a pocillo. Cuando los polianiones son ácidos nucleicos como el ADN o el ARN, los ácidos nucleicos se pueden agregar a los pocillos y, opcionalmente, almacenarse antes de contactar con las células objetivo.

Los métodos de esta descripción opcionalmente comprenden la etapa de poner en contacto el uno o más lípidos catiónicos con uno o más lípidos auxiliares o neutros antes o al mismo tiempo que contactar el complejo ácido nucleico-péptido con uno o más lípidos catiónicos para formar agregados lipídicos encapsulando el ácido nucleico-péptido. Los métodos también comprenden opcionalmente formar los agregados lipídicos en liposomas antes del contacto con el ácido nucleico. En otros ejemplos, los liposomas se forman por microfluidización, extrusión u otros medios conocidos en la técnica. Los ácidos nucleicos son preferentemente ADN o ARN que inhiben la expresión de un gen objetivo. Preferentemente, el ácido nucleico se asocia con una transcripción del gen para efectuar la inhibición. Preferentemente, el ácido nucleico es ARNi, ARNip, ARNhc, o ARNtp, y está opcionalmente químicamente modificado.

Los volúmenes y las concentraciones de ácido nucleico u otra macromolécula, el volumen y la concentración de los complejos de transfección proporcionados en la presente, los volúmenes y composiciones de diluyentes, y el volumen y la concentración de células, se pueden determinar mediante el uso de enfoques experimentales estándar para dicha optimización y titulación, que incluyen, por ejemplo, los métodos que utilizan ensayos de citotoxicidad y/o métodos que emplean la transfección mediante el uso de vectores de expresión de ácido nucleico que expresan genes reporteros, tales como beta galactosidasa, luciferasa y/o proteínas fluorescentes. Además, las densidades celulares se pueden optimizar mediante el uso de métodos estándar, y las densidades celulares para las transfecciones mediante el uso de los complejos de transfección proporcionados en la presente descripción pueden variar, por ejemplo, de alta densidad >75 % a baja densidad <50 %

Los diluyentes ilustrativos para reacciones de formación del complejo, por ejemplo, incluyen medios con suero

reducido o libres de suero, tales como D-MEM y RPMI 1640 y OptiPro™, Opti-MEM® (Invitrogen Corporation). Los tiempos de incubación para formar complejos se pueden determinar mediante el uso de métodos de rutina, aunque los tiempos de incubación típicos están entre 5 y 240 minutos. Además, se entenderá que los medios para el cultivo de células antes y después de la transfección se pueden elegir en función de la línea celular a transfectar y en función de la aplicación particular del método. Por ejemplo, para la producción de proteínas en células en suspensión, en ejemplos ilustrativos, se puede usar el medio con suero reducido, o ventajosamente libre de suero. En ciertos ejemplos ilustrativos, se emplea medio libre de origen animal, tal como, pero sin limitarse a, medio de expresión 293 (Invitrogen Corporation) y medio CD-CHO (Invitrogen Corporation). En ciertos aspectos, dependiendo del tipo de célula a transfectar, los antibióticos pueden excluirse de los medios posteriores a la transfección. Los tiempos de incubación para el cultivo de células después de la transfección varían según el tipo de célula y el resultado deseado de la transfección, pero típicamente se encuentran en el intervalo de 2 horas a 7 días. Para la producción de proteínas a gran escala, las células pueden incubarse, como un ejemplo no limitante, entre 1 día y 7 días.

Se entenderá que se puede usar un amplio intervalo de concentraciones de agente de transfección y un agente de fusión en los complejos, composiciones y métodos proporcionados en la presente descripción. Por ejemplo, en un ejemplo ilustrativo no limitante de una composición que incluye un complejo de un lípido catiónico y un péptido de origen no natural, la concentración combinada ilustrativa total no limitante de lípido catiónico y péptido de origen no natural en la composición puede estar entre 1 mg/ml y 4 mg/ml. El intervalo de péptido adicionado al lípido a 1 mg/ml puede estar entre 100 mg/ml y 3 mg/ml. La relación del lípido catiónico al lípido auxiliar puede estar entre 0,5/1,0 (molar) y el compuesto puro.

Las células que se pueden transfectar de acuerdo con la presente descripción incluyen, por ejemplo, prácticamente cualquier célula eucariota, que incluyen las células primarias, las células en cultivo y las células en tejido cultivado, particularmente las células que se consideran difíciles de transfectar. Las células pueden estar unidas a células o células en suspensiones. En ciertos aspectos ilustrativos, las células son células CHO-S en suspensión y células 293-F en suspensión. Los cultivos celulares en suspensión son particularmente adecuados para los métodos de producción de proteínas proporcionados en la presente. Otras células que se pueden transfectar mediante el uso de los agentes y métodos de la descripción incluyen, pero no se limitan a, 293, tal como GripTite 293 MSR (Invitrogen Corporation), CHO, Cos7, NIH3T3, Hela, fibroblastos primarios, A549, Be2C, SW480, Caco2, neuronas primarias, células Jurkat, C6, THP1, IMR90, HeLa, ChoK1, GT293, MCF7 HT1080, LnCap, HepG2, PC12, SKBR3 y K562, o cualquier célula enumerada en la Tabla 6.

En ciertos ejemplos proporcionados en la presente descripción, se incluye un agente potenciador de la transfección en el complejo que se usa para transfectar células. Por ejemplo, el agente potenciador de la transfección puede ser un péptido de localización nuclear. En un ejemplo, el agente potenciador de la transfección es el reactivo PLUS™ (Invitrogen Corporation). Se ha demostrado que la adición del reactivo PLUS™ mejora la expresión de la proteína cuando se usa junto con composiciones para la transfección como se proporciona en la presente descripción. La citotoxicidad no se vio afectada por el uso del reactivo PLUS™.

En otro ejemplo, se proporciona en la presente un método para producir una proteína que comprende, transfectar una célula con una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína, incubar la célula para producir la proteína y recolectar la proteína, en donde la transfección se realiza poniendo en contacto la célula con una composición para la transfección que incluye un péptido de origen no natural de la presente descripción. La composición para transfectar la célula puede ser cualquier composición como se proporciona en la presente descripción. Las composiciones ilustrativas incluyen la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de interés, en complejo con un péptido de origen no natural de la presente descripción, opcionalmente un agente de fusión y un agente de transfección.

En ejemplos ilustrativos, la proteína codificada es una molécula de anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno o una porción derivada de esta, por ejemplo, un fragmento Fv de cadena sencilla. En estos ejemplos, el método puede incluir además aislar la proteína, por ejemplo, mediante el uso de la purificación por afinidad en una columna de unión a anticuerpos. En ciertos ejemplos, los ácidos nucleicos que codifican ambas cadenas de un anticuerpo se transfectan en células mediante el uso de una composición para la transfección proporcionada en la presente descripción.

Se entenderá que el ácido nucleico que codifica la proteína puede ser un vector de expresión. El vector de expresión típicamente tiene un promotor unido operativamente a una o más secuencias de ácido nucleico que codifican una o más cadenas de proteínas. Cuando la proteína producida es un producto farmacéutico, la proteína puede formularse en consecuencia, por ejemplo, en una elección apropiada de medio fisiológico.

La composición para la transfección proporcionada en la presente descripción también se puede usar para introducir péptidos y proteínas y similares en las células mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. Se han descrito previamente métodos para usar lípidos catiónicos para el suministro de péptidos y proteínas. Además, las composiciones para la transfección se pueden usar para administrar ácidos nucleicos, péptidos y proteínas y similares en tejidos in vivo. Se han descrito previamente métodos para usar lípidos que suministran compuestos al tejido in vivo. Las composiciones para la transfección se pueden emplear, con la elección apropiada del medio fisiológico, en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico.

Kits de reactivos:

La descripción se dirige además a los kits que contienen, al menos en un primer recipiente adecuado, al menos un péptido de origen no natural de acuerdo con la presente descripción. Los kits de la presente descripción pueden comprender además uno o más recipientes que comprenden un reactivo que facilita la introducción de al menos una macromolécula, por ejemplo, un reactivo de transfección catiónica, opcionalmente uno o más lípidos auxiliares o lípidos neutros, y opcionalmente pueden estar provistos de una carga, tal como, por ejemplo, un ácido nucleico u otra carga como se definió anteriormente. Los reactivos de transfección preferidos incluyen, pero sin limitarse a, lípidos catiónicos y similares.

Los componentes de las composiciones para la transfección de esta descripción se pueden proporcionar en un kit de reactivos. El kit puede contener un agente de transfección y un péptido de origen no natural de la presente descripción. Este kit también puede incluir opcionalmente un agente potenciador de la transfección tal como un péptido potenciador de la transfección, proteína o fragmento de esta o un compuesto potenciador de la transfección. El agente de transfección, el péptido de origen no natural y el agente potenciador de la transfección opcional, cuando está presente, se pueden incluir como una mezcla (es decir, en un solo recipiente, típicamente un tubo y/o vial), o se pueden incluir como porciones separadas (es decir, en recipientes separados, por ejemplo, viales y/o tubos separados). Los kits de la presente descripción, como se entenderá, típicamente incluyen recipientes, tales como viales y/o tubos, que se empaquetan juntos, por ejemplo, en una caja de cartón u otro embalaje. Los kits se pueden enviar de un proveedor a un cliente. Por ejemplo, en un ejemplo proporcionado en la presente es un kit que incluye un vial que incluye una formulación liposomal que incluye un agente de transfección y un péptido potenciador de la transfección. El kit también puede incluir, por ejemplo, un recipiente separado que incluye un agente potenciador de la transfección, tal como un péptido potenciador de la transfección, por ejemplo, Plus Reagent™ (Invitrogen Corp., Carlsbad, California). El kit también puede incluir en recipientes separados, células, medio de cultivo celular, y una secuencia de ácido nucleico reportero, tal como un plásmido que expresa un gen reportero. En ciertos ejemplos, el medio de cultivo puede ser medio de suero reducido y/o medio de expresión de proteínas.

En un ejemplo, un kit comprende porciones individuales o una mezcla de lípidos catiónicos, tales como, pero sin limitarse a, un lípido de Fórmula I, opcionalmente en combinación con uno o más lípidos auxiliares y/o uno o más lípidos neutros y péptidos, proteína o fragmento de esta o péptido modificado, proteína o fragmento de esta de la presente descripción. En otra modalidad, un kit comprende porciones individuales o una mezcla de polímeros policatiónicos y péptidos, proteínas o fragmentos de estos o péptidos modificados, proteínas o fragmentos de estos de la presente descripción. Los kits de transfección de lípidos catiónicos pueden incluir opcionalmente lípidos neutros, así como otros agentes potenciadores de la transfección u otros aditivos, y las cantidades relativas de componentes en el kit pueden ajustarse para facilitar la preparación de composiciones para la transfección. Los componentes del kit pueden incluir medios o solventes apropiados para otros componentes del kit.

Se prefieren los kits de transfección de lípidos catiónicos que comprenden una composición de lípidos monocatiónicos o policatiónicos, tales como, pero sin limitarse a, un lípido de Fórmula I, y que incluyen además un lípido neutro y un péptido o proteína de la presente descripción.

Los kits de transfección de dendrímero pueden incluir opcionalmente otros agentes potenciadores de la transfección, tales como DEAE-dextrano y/o cloroquina, así como otros aditivos y las cantidades relativas de componentes en el kit pueden ajustarse para facilitar la preparación de composiciones para la transfección.

Los kits proporcionados por esta descripción incluyen los que comprenden una porción individual de una composición de lípidos policatiónicos que comprende DOSPA y DOPE o una composición de lípidos monocatiónicos que comprende DOTMA y DOPE y una porción de péptido modificado, opcionalmente un péptido modificado con espermina o espermidina. Los kits proporcionados por esta descripción incluyen aquellos que comprenden una porción individual de un polímero policatiónico y una porción de un péptido modificado con espermina.

En modalidades relacionadas, los kits de esta descripción pueden comprender un conjugado de péptido o proteína-lípido o un conjugado de péptido o proteína-polímero policatiónico en combinación con lípidos no conjugados, polímero policatiónico no conjugado y otros agentes para facilitar la transfección.

Los kits de esta descripción pueden incluir aquellos útiles en métodos de diagnóstico, por ejemplo, los kits de diagnóstico que además del agente de transfección y los agentes potenciadores de la transfección (por ejemplo, proteínas, péptidos y fragmentos y modificaciones de péptidos y proteínas) pueden contener un ácido nucleico de diagnóstico. Un ácido nucleico de diagnóstico es un término general para cualquier ácido nucleico que puede emplearse para detectar la presencia de otra sustancia (más generalmente un analito) en una célula. Por ejemplo, cuando se transfecta en una célula, un ácido nucleico de diagnóstico puede aumentar o disminuir la expresión de un gen en este en respuesta a la presencia de otra sustancia en la célula (por ejemplo, una proteína, molécula pequeña, esteroide, hormona u otro ácido nucleico). Los ácidos nucleicos de diagnóstico también incluyen aquellos ácidos nucleicos que llevan algún marcador o marcador detectable de otra manera a una célula o tejido objetivo particular para la detección de la célula o tejido objetivo o para la detección de una sustancia en la célula o tejido objetivo.

Los ácidos nucleicos que se pueden transfectar mediante los métodos de esta descripción incluyen ADN y ARN de cualquier tamaño de cualquier fuente que comprenda bases naturales o bases no naturales, e incluyen aquellos que codifican y son capaces de expresar proteínas terapéuticas o útiles de otro modo en las células, aquellas que inhiben expresión no deseada de ácidos nucleicos en las células, aquellas que inhiben la actividad enzimática no deseada o activan las enzimas deseadas, las que catalizan reacciones (ribozimas) y las que funcionan en ensayos de diagnóstico (por ejemplo, ácidos nucleicos de diagnóstico). Los ácidos nucleicos terapéuticos incluyen aquellos ácidos nucleicos que codifican o pueden expresar proteínas, péptidos o polipéptidos terapéuticamente útiles en las células, aquellos que inhiben la expresión no deseada de ácidos nucleicos en las células y aquellos que inhiben la actividad enzimática no deseada o activan las enzimas deseadas en las células.

Las composiciones y métodos proporcionados en la presente descripción también se pueden adaptar fácilmente a la vista de la descripción en la presente descripción para introducir macromoléculas biológicamente activas distintas de los ácidos nucleicos que incluyen, entre otros, poliaminas, ácidos de poliamina, polipéptidos y proteínas en células eucariotas. Otros materiales útiles, por ejemplo, como agentes terapéuticos, materiales de diagnóstico, reactivos de investigación, que pueden unirse a los péptidos y péptidos modificados e introducirse en células eucariotas mediante los métodos de esta descripción.

Los lípidos de Fórmula I se pueden usar como los lípidos catiónicos de los kits descritos anteriormente, y se pueden proporcionar independientemente en un kit de reactivos. En general, el kit contiene un lípido de Fórmula (I) en un recipiente adecuado. El lípido puede estar, por ejemplo, en una solución de un solvente orgánico, como etanol, en un tampón o en una mezcla de solvente/tampón. Además, el kit puede incluir, pero sin limitarse a, un lípido de Fórmula (I), y una secuencia de aminoácidos de una proteína no natural que mejora o promueve la fusión de la membrana de un portador de liposomas con una membrana celular en un disolvente o tampón adecuado.

En una modalidad, un kit puede comprender porciones individuales o una mezcla de, por ejemplo, lípidos de Fórmula (I) u otros lípidos catiónicos y péptidos, proteínas o fragmentos de estos o péptidos, proteínas o fragmentos modificados de estos. Los kits que incluyen lípidos de Fórmula (I) u otros lípidos catiónicos pueden incluir opcionalmente lípidos neutros, así como otros agentes potenciadores de la transfección u otros aditivos, y las cantidades relativas de componentes en el kit pueden ajustarse para facilitar la preparación de las composiciones para la transfección. Los componentes del kit pueden incluir medios o solventes apropiados para otros componentes del kit.

Se prefieren los kits que incluyen lípidos de Fórmula (I) u otros lípidos catiónicos, un lípido neutro y un péptido o proteína modificados. Los kits proporcionados por esta descripción incluyen aquellas composiciones que comprenden una porción individual de un lípido de Fórmula (I), DOPE y una porción de péptido, particularmente un péptido modificado con espermina. Los kits proporcionados por esta descripción incluyen aquellos que comprenden una porción individual de un lípido de Fórmula (I), y una porción de un péptido modificado que contiene un tramo de aminoácidos básicos tales como lisina, ornitina, o arginina.

Métodos para la venta

También se proporciona un método para vender un péptido de origen no natural, un lípido, un complejo de transfección, una composición para la transfección y/o un kit que se proporciona en la presente descripción, que comprende presentar a un cliente un identificador que identifica el péptido de origen no natural, el lípido, el complejo y/o composición para la transfección, y/o un kit proporcionado en la presente, y proporcionar acceso al cliente a una función de compra para comprar el péptido de origen no natural, lípido, complejo de transfección, composición para la transfección y/o kit proporcionados en la presente descripción mediante el uso del identificador. El identificador generalmente se presenta al cliente como parte de un sistema de pedidos. El sistema de pedido puede incluir una función de entrada para identificar un producto deseado y una función de compra para comprar un producto deseado que se identifica. El sistema de pedidos generalmente está bajo el control directo o indirecto de un proveedor. Un cliente como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier individuo, institución, corporación, universidad u organización que busque obtener productos y servicios de investigación biológica. Un proveedor como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier individuo, institución, corporación, universidad u organización que busque proporcionar productos y servicios de investigación biológica.

La presente descripción también proporciona un método para vender un péptido de origen no natural, un lípido, un complejo de transfección, una composición para la transfección y/o un kit que comprende: presentar a un cliente una función de entrada de un sistema de pedido telefónico y/o presentar a un cliente un campo de entrada de datos o una lista seleccionable de entradas como parte de un sistema informático, en donde el péptido de origen no natural, lípido, complejo de transfección, composición para la transfección y/o kit se identifican mediante el uso de la función de entrada. Cuando la función de entrada es parte de un sistema informático, como la que se muestra en una o más páginas de un sitio de Internet, al cliente generalmente se le presenta una función de compra en línea, como un carrito de compras en línea, en donde se utiliza la función de compra por el cliente para comprar el péptido de origen no natural, el lípido, el complejo de transfección, la composición para la transfección y/o el kit identificados. En un aspecto, se proporciona una pluralidad de identificadores a un cliente, cada uno de los cuales identifica un péptido de origen no natural, lípido, complejo y/o composición para la transfección no natural, y/o un kit proporcionado en la presente

descripción, o un volumen o peso diferente del péptido de origen no natural, lípido, complejo y/o composición para la transfección, y/o un kit proporcionado en la presente descripción. El método puede comprender además activar la función de compra para comprar el lípido, el complejo de transfección, la composición para la transfección y/o el kit proporcionado en la presente descripción. El método puede comprender además el envío al cliente del péptido de origen no natural, lípido, complejo de transfección, composición para la transfección y/o kit proporcionados en la presente descripción por el proveedor. El péptido de origen no natural, el lípido, el complejo de transfección, la composición para la transfección y/o el kit pueden ser enviados por un proveedor al cliente. El proveedor generalmente controla la función de entrada y puede controlar el sitio web al que se accede para acceder a la función de entrada para comprar un péptido de origen no natural, lípido, complejo y/o composición para la transfección, y/o un kit proporcionado en la presente descripción.

Composiciones Farmacéuticas

Los agentes de transfección y los agentes potenciadores de la transfección de esta descripción se pueden proporcionar en una variedad de composiciones farmacéuticas y formas de dosificación para las aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, las formulaciones inyectables, las formulaciones intranasales y las formulaciones para administración intravenosa y/o intralesional que contienen estos complejos pueden usarse como terapia.

Generalmente, las composiciones farmacéuticas de esta descripción deberían contener suficiente agente de transfección y cualquier agente potenciador (péptido, proteína, etc.) para proporcionar la introducción de un nivel suficientemente alto de ácido nucleico en la célula o tejido objetivo de manera tal que el ácido nucleico tenga el efecto terapéutico deseado en ella. El nivel de ácido nucleico en la célula o tejido objetivo que será terapéuticamente efectivo dependerá de la eficacia de la inhibición u otra función biológica y del número de sitios que el ácido nucleico debe afectar.

La dosificación de las composiciones para la transfección descritas en la presente descripción y administradas a un paciente dependerá de una serie de otros factores que incluyen el método y el sitio de administración, la edad, el peso y el estado del paciente. Los expertos en la técnica pueden ajustar fácilmente las dosis para un tipo dado de administración, un paciente dado y para una aplicación terapéutica dada.

Los expertos en la técnica apreciarán que la composición para la transfección debe contener cantidades mínimas de componentes inhibitorios, tales como suero o niveles elevados de sal, que pueden inhibir la introducción de ácido nucleico en la célula, o interferir con la transfección o formación del complejo con el ácido nucleico. También se apreciará que cualquier composición farmacéutica o terapéutica, dependiendo de la aplicación particular, debe contener cantidades mínimas de componentes que puedan causar efectos secundarios perjudiciales en un paciente.

Las composiciones para la transfección descritas en la presente descripción pueden formularse en composiciones que incluyen un agente farmacéuticamente activo y diluyentes, excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables para el mismo. Dichas composiciones pueden estar en formas de dosificación unitarias tales como tabletas, píldoras, cápsulas (que incluyen las formulaciones de liberación sostenida o de liberación retardada), polvos, gránulos, elixires, tinturas, jarabes y emulsiones, soluciones o suspensiones parenterales estériles, aerosoles o aerosoles líquidos, gotas, ampollas, dispositivos de inyección automática o supositorios; para administración oral, parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular o subcutánea), intranasal, sublingual o rectal, o para administración por inhalación o insuflación, y puede formularse de manera apropiada y de acuerdo con prácticas aceptadas como las descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, (Gennaro, edición, Mack Publishing Co., Easton Pa., 1990).

Algunos ejemplos de portadores, excipientes y diluyentes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma de acacia, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, hidroxibenzoatos de metilo y propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes conservantes, agentes edulcorantes o agentes aromatizantes. Cuando el portador sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido que actúa como vehículo, excipiente o medio para el ingrediente activo. En el caso de las inyecciones, es posible preparar soluciones o liposomas de uno o más lípidos de la presente descripción en portadores farmacéuticamente aceptables, tal como un disolvente acuoso o no acuoso. Ejemplos de disolventes que se pueden usar son agua destilada para inyección, solución salina fisiológica, solución de Ringer, aceite vegetal, glicéridos de ácidos grasos sintéticos, ésteres de ácidos grasos superiores, propilenglicol y similares.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertos aspectos de la descripción y para ayudar a los expertos en la técnica a practicar la descripción. De ninguna manera debe considerarse que estos ejemplos limitan el alcance de la descripción.

Ejemplo 1. Preparación de complejos de agregado lipídico/polipéptido y transfección de células cultivadas

- Todas las células se cultivaron en condiciones de cultivo estándar recomendadas para cada línea celular por la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Aproximadamente 24 horas antes de las transfecciones, las células se sembraron para que tuvieran un 70-90 % de confluencia el día de la transfección. Las siguientes pautas son generalmente aplicables, aunque existen variaciones menores que se apreciarán fácilmente por un experto en la técnica, y dependiendo de la identidad de la línea celular, sus características y necesidades de crecimiento, y su morfología en el cultivo adherente. Generalmente, para una placa de 96 pocillos, se sembraron entre $1-4 \times 10^4$ células por pocillo, para una placa de 24 pocillos se sembraron $0,5-2 \times 10^5$ células por pocillo, para una placa de 6 pocillos se sembraron $0,25-1 \times 10^6$ células.
- 5
- 10 Los complejos de transfección para transfectar ADN en las células en cultivo se prepararon de acuerdo con el protocolo del fabricante. LIPOFECTAMINE® 2000 y LIPIFECTAMINE® LTX se adquirieron de Life Technologies Corp. (Carlsbad, California), FUGENE® HD se adquirió de Promega Corp. (Fitchburg, WI) y X-TREMEGENE™ HP se adquirieron de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza).
- 15 Para preparar complejos de transfección que contienen los péptidos de origen no natural descritos anteriormente, el péptido 1 que tiene la siguiente secuencia SRRARRSPRESGKKRKRKRGGGSGGGSGGGSRRRRRRRRRRRR (SEQ ID NO. 89) se sintetizó y se proporcionó como un polvo seco. El polvo seco se reconstituyó en agua ultrapura estéril hasta una concentración final de 4,35 mg/ml y se dejó disolver por completo. Esta solución de péptido de reserva se dejó a un lado para usar en la siguiente etapa.
- 20 Para preparar los complejos de agregado lipídico-ADN-péptido, se obtuvo el reactivo LIPOFECTAMINE® 3000 (Life Technologies Corp., Carlsbad, California). Para cada pocillo de una placa de células de 96, 24 o 6 pocillos a transfectar, se colocó una alícuota de medio Gibco® Opti-MEM® en un tubo Eppendorf de plástico desechable por separado de 5 ml, 25 ml, y 125 µl. Entre 0,1 µl a 0,6 µl para una placa de 96 pocillos, 0,5 µl a 3,0 µl para una placa de 24 pocillos, o 2,0 µl a 15 µl para una placa de 6 pocillos de reactivo LIPOFECTAMINE® 3000 se añadió al Opti-MEM® alícuotado, se mezcló bien y se incubó a temperatura ambiente.
- 25 En un tubo Eppendorf separado, 5 µl (por cada pocillo de una placa de 96 pocillos), 25 µl (por cada pocillo de una placa de 24 pocillos) o 125 µl (por cada pocillo de una placa de 6 pocillos) de medio Gibco® Opti-MEM® se dividió en alícuotas en un tubo para cada pocillo de células cultivadas a transfectar, en donde se mezclaron 0,1 µg de ADN de vector de expresión pcDNAEF1a/emGFP o GST-STAT para cada pocillo de una placa de 96 pocillos, 0,5 µg de ADN de vector de expresión pcDNAEF1a/emGFP o GST-STAT para cada pocillo de una placa de 24 pocillos, y 2,5 µg de ADN de vector de expresión pcDNAEF1a/emGFP o GST-STAT para cada pocillo de una placa de 6 pocillos.
- 30 En la mezcla de ADN diluida se añadió 0,2 µl del péptido de reserva para cada pocillo de una placa de 96 pocillos, 1 µl de péptido de reserva para cada pocillo de una placa de 24 pocillos y 5 µl de la solución de péptido de reserva para cada pocillo de una placa de 6 pocillos, y la mezcla de péptido/ADN se mezcló bien y se incubó durante aproximadamente 1 minuto a temperatura ambiente.
- 35 Para cada pocillo de una placa de 96 pocillos, se mezcló 5 µl de la mezcla diluida de ADN/péptido con 5 µl del reactivo LIPOFECTAMINE® 3000 diluido, para cada pocillo de una placa de 24 pocillos, se mezcló 25 µl de la mezcla ADN/péptido diluida con 25 µl del reactivo LIPOFECTAMINE® 3000 diluido, y para cada pocillo de una placa de 6 pocillos, se mezcló 125 µl de la mezcla de ADN/péptido diluido con 125 µl del reactivo LIPOFECTAMINE® 3000 diluido y los complejos lípido-péptido-ADN se dejaron formar incubando la mezcla resultante durante aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente.
- 40 Después de la incubación, los complejos de lípido-péptido-ADN se añadieron a las células que se sembraron el día anterior con medio de crecimiento fresco; para placas de 96 pocillos, se añadieron 10 µl de lípido-péptido-ADN a las células, para placas de 24 pocillos, se añadieron 50 µl de la mezcla de lípido-péptido-ADN a las células, para placas de 6 pocillos, 250 µl del péptido-péptido-ADN se añadió a las células. Las células se incubaron en presencia de lípido-péptido-ADN durante aproximadamente 24-48 horas, y se analizaron.
- 45
- 50
- Ejemplo 2. Transfección de diversas líneas celulares.
- 55 Un panel de 10 líneas celulares de cáncer difíciles de transfectar (HepG2, Hepa1-6, Hep3B, HUH7, MCF-7, MDA-MB-23, SKBR3, LNCaP, Bend3 y T986), dos líneas celulares neuronales difíciles de transfectar (PC12 y Neuro2A), dos líneas celulares de mioblastos difíciles de transfectar (H9C2 y C2C12) y una línea celular de fibroblastos renales (Vero) difíciles de transfectar se transfectaron con pcDNAEF1a/emGFP, un vector de expresión que codifica GFP, de acuerdo con los métodos establecidos en el Ejemplo 1. Después de 24 horas en presencia de los complejos de transfección, las células se visualizaron mediante el uso de la microscopía de fluorescencia a la longitud de onda apropiada.
- 60 La expresión de GFP en las líneas celulares de cáncer se muestra en la Figura 1A, en las células neuronales se muestra en la Figura 1B, en las células de mioblastos se muestra en la Figura 1C, y en las células de fibroblastos renales se muestra en la Figura 1D.
- 65
- Ejemplo 3. Comparación de diversos reactivos de transfección.

- Un panel de seis líneas celulares diferentes (HEK293, HeLa, COS-7, LNCaP, A549 y HepG2) se transfectaron con pcDNAEF1a/emGFP mediante el uso de FUGENE® HD, LIPOFECTAMINE® 2000 o LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con el Péptido 1 como se describe en el Ejemplo 1. Las células se dejaron transfectar durante 48 horas. Los resultados mostrados en la Figura 2 muestran que, si bien tanto FUGENE® HD como LIPOFECTAMINE® 2000 pudieron transfectar una pequeña porción de cada una de las células (Figura 2, primeras dos columnas), la presencia del péptido 1 en el complejo de transfección mejoró sustancialmente la eficiencia de transfección (Figura 2, última columna).
- Para extender este estudio, se transfectó como anteriormente un panel de 61 líneas celulares diferentes mediante el uso de LIPOFECTAMINE® 2000 o LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con el péptido 1 como se describió en el Ejemplo 1. Aproximadamente 48 horas después de la transfección, las células transfectadas se examinaron por microscopía de fluorescencia para determinar la eficacia de transfección relativa, y los extractos celulares se prepararon y analizaron mediante el uso de un lector de microplacas de fluorescencia FL600 para medir la mejoría de la expresión de GFP de LIPOFECTAMINE® 3000 con el péptido 1 sobre LIPOFECTAMINE® 2000. Los resultados se muestran en la Tabla 6. Como se puede ver, usar el reactivo LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con el péptido 1 produce mayores eficacias de transfección y expresión de proteínas que el reactivo LIPOFECTAMINE® 2000 cuando se prueba en una variedad de líneas celulares.
- Tabla 6. Rendimiento de las formulaciones de agregado lipídico LIPOFECTAMINE® 3000 y Péptido1 in vitro en diversas líneas celulares, medido por la eficacia de la transfección relativa y la mejora de la eficacia de la transfección en comparación con la transfección de LIPOFECTAMINE® 2000.

Línea celular	Linaje celular/tisular	Eficacia relativa de la transfección (%)	Veces de mejora de la expresión de proteínas sobre LIPOFECTAMINE® 2000
3T3	Fibroblasto embrionario de ratón, inmortalizado	51-79 %	11
4T1	Tumor mamario de ratón, epitelial	51-79 %	2
A431	Carcinoma epidermoide humano, epitelial	< 30 %	4
A549	Carcinoma de pulmón humano, epitelial	51-79 %	3
ACHN	Célula renal metastásica humana, adenocarcinoma	30-50 %	2
bEnd.3	Endotelioma cerebral de ratón, viral transformado	< 30 %	9
BJ	Prepucio humano, epitelial inmortalizado	< 30 %	3
BT-549	Carcinoma de mama humano, epitelial	51-79 %	4
C2C12	Mioblasto de ratón, inmortalizado	51-79 %	14
C6	Glioma de rata	30-50 %	5
Caco-2	Carcinoma colorrectal humano, epitelial	51-79 %	2
Caki-1	Carcinoma de riñón humano, epitelial	< 30 %	4
CHO-K1	Ovario de hámster chino, epitelial inmortalizado	51-79 %	1
CHO-S	Ovario de hámster chino, suspensión adaptada	< 30 %	1
COLO 205	Carcinoma colorrectal humano, epitelial	< 30 %	4
COS-7	Fibroblasto de riñón de mono verde africano, virus transformado	51-79 %	4
DU 145	Tumor de próstata metastásico humano, epitelial	30-50 %	2
H460	Carcinoma de pulmón humano, células grandes, epiteliales	51-79 %	3

Continuación

Línea celular	Linaje celular/tisular	Eficacia relativa de la transfección (%)	Veces de mejora de la expresión de proteínas sobre LIPOFECTAMINE® 2000
H9c2	Mioblasto embrionario de rata (corazón)	51-79 %	3
HCC1937	Tumor mamario humano, epitelial	< 30 %	5
HCT1 16	carcinoma de colon humano, epitelial	> 80 %	1
HEK 293	Fibroblastos de riñón embrionario humano, inmortalizado	> 80 %	2
HeLa	Carcinoma cervical humano, epitelial	> 80 %	3
Hep-3B	Carcinoma hepatocelular humano, epitelial	51-79 %	2
Hepa 1-6	Carcinoma hepatocelular de ratón, epitelial	51-79 %	6
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano, epitelial	> 80 %	16
Hs 578T	Carcinoma de mama humano, epitelial	> 80 %	3
cHT29	carcinoma de colon humano, epitelial	< 30 %	1
Huh-7	Carcinoma hepatocelular humano, epitelial	51-79 %	4
Jurkat	Célula T humana, inmortalizada	< 30 %	1
K-562	Leucemia mielógena humana	30-50 %	2
L6	Mioblasto de rata	30-50 %	8
L929	Fibrosarcoma de ratón	Hasta 30 %	2
LNCaP	Adenocarcinoma de próstata humano	> 80 %	10
MCF 10A	Carcinoma de mama humano, epitelial	30-50 %	5
MCF7	Carcinoma de mama humano, epitelial	30-50 %	2
MDA-MB-231	Carcinoma de mama humano, epitelial	51-79 %	3
MDA-MB-435	Carcinoma de mama humano, epitelial	51-79 %	3
MDA-MB-468	Carcinoma de mama humano, epitelial	< 30 %	9
MDCK	Riñón canino, inmortalizado	< 30 %	1
Neuro-2a	Neuroblastoma de ratón	> 80 %	1
NCI-H23	Adenocarcinoma de pulmón humano	51-79 %	2
NCI-H460	Carcinoma de pulmón humano, células grandes	< 30 %	17
P19	Carcinoma embrionario de ratón/teratocarcinoma	30-50 %	1
PANC-1	Carcinoma pancreático humano, epitelial	51-79 %	3
PC12	Feocromocitoma de rata	51-79 %	2
RAW264.7	Macrófago de ratón, virus transformado	< 30 %	4
RBL-2H3	Leucemia basófila de rata	< 30 %	2
RD	Rabdomiosarcoma humano	51-79 %	4

Continuación

	Línea celular	Linaje celular/tisular	Eficacia relativa de la transfección (%)	Veces de mejora de la expresión de proteínas sobre LIPOFECTAMINE® 2000
5	Saos-2	Osteosarcoma humano	51-79 %	4
	SH-SY5Y	Neuroblastoma humano	< 30 %	1
	SK-BR-3	Carcinoma de mama humano, epitelial	51-79 %	4
10	SK-MEL-28	Melanoma humano	51-79 %	2
	SK-N-SH	Línea celular de neuroblastoma	30-50 %	6
	SK-OV-3	Carcinoma de ovario humano	30-50 %	3
15	SW480	Adenocarcinoma colorrectal humano	51-79 %	2
	SW620	Adenocarcinoma colorrectal humano	< 30 %	5
	T98G	Glioblastoma humano	51-79 %	4
20	U2OS	Osteosarcoma humano	> 80 %	3
	U937	Leucemia histiocítica humana	< 30 %	2
25	Vero	Riñón de mono verde africano, epitelial	30-50 %	8

Ejemplo 4. Efecto de la dosis de reactivo de transfección sobre la eficacia de la transfección y la expresión de proteínas

30 Las células HeLa se sembraron en placas de 96 pocillos y se transfectaron con pcDNAEF1a/emGFP mediante el uso de 0,1 µl, 0,2 µl, 0,3 µl o 0,4 µl de LIPOFECTAMINE® 2000, LIPOFECTAMINE® LTX, o reactivo LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con el péptido 1 como se describe en el Ejemplo 1. La eficacia de la transfección y la expresión relativa de proteínas, medida por la luminiscencia relativa, se determinaron para cada condición. Los resultados se muestran en la Figura 3.

35 La Figura 3A es un gráfico que compara la eficacia de la transfección relativa para un vector de expresión que codifica GFP transfectado en células HeLa cultivadas mediante el uso de dosis crecientes de tres formulaciones de agregados lipídicos diferentes disponibles en el comercio, LIPOFECTAMINE® 2000 (círculos abiertos), LIPOFECTAMINE® LTX (cuadrados abiertos) y LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con un péptido de acuerdo con una modalidad (triángulos abiertos). La presencia del péptido 1 en el complejo de transfección mejora la eficacia de la transfección de las células en todo el intervalo de dosis de reactivo de transfección probadas. La mejora en la eficacia de la transfección se pronuncia particularmente en la dosis más baja probada.

45 La Figura 3B es un gráfico que compara la intensidad de la expresión de GFP en células HeLa transfectadas con un vector de expresión que codifica GFP mediante el uso de una dosis creciente de tres formulaciones de agregados lipídicos disponibles en el comercio, LIPOFECTAMINE® 2000 (círculos abiertos), LIPOFECTAMINE® LTX (cuadrados abiertos) y LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con un péptido de acuerdo con una modalidad (triángulos abiertos). La presencia del péptido 1 en el complejo de transfección mejora la expresión relativa de GFP en las células en todo el intervalo de dosis de reactivo de transfección analizadas. La mejora en la expresión de proteínas es particularmente pronunciada en la dosis más baja probada.

50 Ejemplo 5. Mejora en la expresión de proteínas en comparación con tres reactivos de transfección disponibles en el comercio.

55 Las células HepG2 se transfectaron en placas de 24 pocillos con un vector de expresión que codifica una proteína de fusión GST-STAT mediante el uso de LIPOFECTAMINE® 2000, FUGENE® HD, X-TREMEGENE™ HP o LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con el péptido 1 como se describió en el Ejemplo 1. Aproximadamente 24 horas después de la transfección, los lisados celulares se prepararon mediante el uso de Tampón de Extracción Celular NOVEX® (Life Technologies, Carlsbad, CA) y los lisados se resolvieron por electroforesis SDS-PAGE, se transfirieron a membranas PVDF, se inmunoelectrotransfirieron con un anticuerpo policlonal anti-GST marcado con HRP, y detectaron con Sustrato de inmunoelectrotransferencia Pierce™ ECL (Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

65 La Figura 4 es una membrana de Western que compara los niveles de expresión relativos de una proteína de fusión GST-STAT (panel superior) en células HepG2 transfectadas con un vector de expresión que codifica una proteína de fusión GST-STAT mediante el uso de las siguientes formulaciones de agregado lipídico disponibles en el comercio: LIPOFECTAMINE® 2000 (primer carril), LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con un péptido de acuerdo con una modalidad (segundo carril), FUGENE® HD (tercer carril) y X-TREMEGENE™ HP (último carril). El panel inferior

muestra una transferencia de western de p-actina endógena para confirmar la carga igual de extracto citosólico en cada carril.

Ejemplo 6. Transfección de la línea de células madre embrionarias humanas H9.

La línea de células madre embrionarias humanas H9 se sembró a una densidad de 37500 células/pocillo en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se transfectó con 50 µg, 100 µg o 200 µg de pcDNAEF1a/emGFP mediante el uso de 0,1 µl a 0,6 µl por pocillo de LIPO-FECTAMINE® 2000 o LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con el péptido 1 como se describió en el Ejemplo 1. Después de 24 horas de transfección, se determinó la eficacia de la transfección.

La Figura 5A es un gráfico que compara la eficacia de la transfección relativa de la línea de células madre embrionarias humanas H9 (37.500 células por pocillo de una placa de 96 pocillos) transfectada con una dosis creciente de un vector de expresión de GFP (50 µg, panel izquierdo; 100 µg panel central y 200 µg panel derecho) y mediante el uso entre 0,1 a 0,6 µl por pocillo de LIPOFECTAMINE® 2000 (triángulos abiertos) o LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con un péptido de acuerdo con una modalidad;

La Figura 5B es una imagen de fluorescencia representativa de la expresión de GFP en células H9 cultivadas en placas de 96 pocillos transfectadas con 100 µg/pocillo mediante el uso de 200 µl de LIPOFECTAMINE® 2000 (panel izquierdo, que demuestra una eficacia de la transfección del 18 % de las células H9) o LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con un péptido de acuerdo con una modalidad (panel derecho, que demuestra un 52 % de eficacia de la transfección de células H9).

Ejemplo 7. Modificación genómica de células mediante el uso el sistema de Vector CRISPR Nucleasa.

Diseño y preparación de plásmidos: GENEART® Precision TALs y Vectores Nucleasa GENEART® CRISPR se diseñaron mediante el uso de la herramienta de diseño web Life Technologies GENEART® (lifetechnologies.com/us/en/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-precision-tals.html). Los TALEN directo e inverso contienen la nucleasa FokI y se dirigen al locus de puerto seguro AAVS1. El sistema de vector CRISPR todo en uno contiene un casete de expresión de nucleasa Cas9 y un casete de clonación de ARN guía que se dirige al locus de puerto seguro AAVS1, combinado con un reportero de proteína fluorescente naranja (OPF) corriente arriba. También se usó un plásmido de control negativo, PCDNA™ 3.3, durante todo el ensayo. Los plásmidos se transformaron en células de *E. coli* competentes. Los clones se analizaron y secuenciaron para determinar su especificidad y después se purificaron mediante el uso de un kit Maxiprep de filtro de plásmido de alta pureza PURELINK® para garantizar una baja actividad de endotoxinas y un ADN de alta calidad.

Se cultivaron células U2OS y HepG2 mediante el uso de GIBCO® DMEM, alto en glucosa, con suplemento GLUTAMAX™ y suero bovino fetal al 10 % durante 4-5 pases después de la descongelación; las células se disociaron mediante el uso de la enzima de disociación TRYPLE™ Express y se sembraron en una placa de 12 pocillos a 2×10^5 células por pocillo en 1 mL de medio completo para asegurar una confluencia del 70-90 % el día de la transfección.

La transfección con el reactivo LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con el péptido 1 y el reactivo LIPOFECTAMINE® 2000 se comparó en cada tipo de célula. Para la transfección con el reactivo LIPOFECTAMINE® 3000, en tubos separados, se diluyeron 1,5 µL del reactivo LIPOFECTAMINE® 3000 y 1 µg del ADN plasmídico en 50 µL del medio de suero reducido OPTI-MEM®; después se añadieron 2 µL del péptido 1 (ver el ejemplo 1) al ADN diluido. El ADN diluido con el péptido 1 se añadió al reactivo LIPOFECTAMINE® 3000 diluido y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después, se añadieron 100 µL del complejo resultante a las células en medio completo. El procedimiento fue el mismo para el reactivo LIPO-FECTAMINE® 2000, excepto que la cantidad del reactivo de la transfección se incrementó a 3 µL y no se añadió el péptido 1 al ADN diluido antes de añadirlo al reactivo LIPOFECTAMINE® 2000 diluido. Todo el análisis posterior se realizó 72 horas después de la transfección.

La expresión de OPF del vector CRISPR se determinó por citometría de flujo y microscopía. Se usó un sistema de imágenes EVOS® FL para adquirir imágenes con el filtro RFP. Las células se disociaron 72 horas después de la transfección con la enzima TRYPLE™ Express y se analizaron mediante el uso de un citómetro de flujo BD ACCURI™ C6 con un filtro FL-2 y láser azul.

La Figura 6 muestra la eficacia de la transfección y la expresión de las proteínas mediante el uso de un vector CRISPR en las células U2OS (Figura 6A) y las células HepG2 (Figura 6B). El vector contenía un gen reportero OPF y se transfectó con el reactivo LIPOFECTAMINE® 2000 o LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con el péptido 1. Los gráficos de barras muestran la expresión relativa del gen OPF (medida por la intensidad de la fluorescencia) y las imágenes de la fluorescencia debajo de los gráficos de barras muestran la intensidad de la fluorescencia cuantificada de las células correspondientes que expresan OPF.

Detección de la escisión genómica: el kit de detección de la escisión genómica GENEART® proporciona un método confiable y rápido para la detección de la escisión específica del locus. Las células transfectadas se disociaron con TRYPLE™ Express, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, y se sedimentaron mediante

centrifugación. Las células se lisaron con el tampón de lisis celular y la mezcla de degradación de las proteínas del kit de detección de la escisión genómica GENEART®. Se extrajo el ADN y después se amplificó por PCR con los cebadores directos e inversos. Después se realizaron reacciones de desnaturalización y rehibridación para hibridar aleatoriamente los fragmentos del PCR mutados y no mutados. Se añadió la enzima de detección (1 µL), la mezcla se incubó durante 1 hora a 37 °C, y la mezcla completa se sometió después a la electroforesis en un gel de agarosa E-Gel® EX al 2 % para determinar el porcentaje de modificación del genoma. El programa ALPHA VIEW™ se usó para determinar la eficacia de la escisión mediante el uso de la siguiente fórmula: eficacia de la escisión = 1 - [(1 - fracción escindida)^{1/2}].

5 La Figura 7A muestra la eficacia de la escisión para las TALEN y CRISPR dirigidas al locus AAVS1 en las células U2OS mediante el uso del LIPOFECTAMINE® 2000 o LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con el péptido 1 de acuerdo con una modalidad.

15 La Figura 7B muestra la eficacia de la escisión para las TALEN y CRISPR dirigidas al locus AAVS1 en las células HepG2 mediante el uso del LIPOFECTAMINE® 2000 o LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con el péptido 1 de acuerdo con una modalidad.

20 Conclusión: las células U2OS, derivadas del osteosarcoma óseo humano, y las células HepG2, derivadas de un carcinoma hepatocelular humano, se transfectaron con LIPOFECTAMINE® 3000 y el péptido 1. Ambas líneas celulares mostraron una mejor eficacia de la transfección y la expresión de las proteínas en comparación con la transfección mediada por LIPOFECTAMINE® 2000. La eficacia de la transfección y la expresión de las proteínas se evaluaron mediante el uso de un constructo CRISPR que contiene el gen reportero OFP. Las células U2OS transfectadas con LIPOFECTAMINE® 3000 y el péptido 1 tuvieron una eficacia de la transfección mejorada 2 veces (datos no mostrados) y una intensidad de la fluorescencia mejorada 4 veces (Figura 6A). Las células HepG2 mostraron una mejora de 20 veces en la eficacia de la transfección (datos no mostrados) y una intensidad de la fluorescencia 80 veces mayor (Figura 6B). Se observó un aumento significativo de la escisión mediada por TALEN y CRISPR para el locus objetivo AAVS1 en ambas líneas celulares transfectadas con LIPOFECTAMINE® 3000 y el péptido 1, lo que demuestra el aumento de la eficacia de la transfección y, por consecuencia, la expresión de las proteínas aumentará la tasa de la escisión de las TALEN y CRISPR. Las células U2OS transfectadas con LIPOFECTAMINE® 3000 y el péptido 1 mostraron una eficacia de la escisión TALEN mejorada 1,5 veces y una escisión CRISPR ligeramente mejorada (Figura 7A). Las células HepG2 tuvieron una eficacia de la escisión 3 veces mayor para las TALEN y 8 veces mayor para las CRISPR (Figura 7B).

35 Ejemplo 8. El reactivo y el péptido de la transfección de lípidos se requieren para mejorar la transfección.

Las células HeLa se sembraron en placas de 96 pocillos y se transfectaron durante 48 horas con 0,2 µg/pocillo de pcDNAEF1a/emGFP mediante el uso de 0,05 µL, 0,1 µL, 0,2 µL, 0,3 µL, 0,4 µL, o 0,5 µL del reactivo LIPOFECTAMINE® 3000 solo (LF3K), LIPO-FECTAMINE® 2000 (LF2K), péptido 1 solo (péptido 1) o LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con el péptido 1 como se describe en el Ejemplo 1 (LF3K + péptido 1). Se determinaron la eficacia de la transfección y la expresión de las proteínas medida por la intensidad de la fluorescencia (FL1-H). Los resultados se representan en la Figura 8.

45 La Figura 8 muestra dos gráficos de barras que representan la eficacia de la transfección relativa (gráfico superior, GFP + como % de las células individuales solamente) o nivel de expresión de GFP relativo por célula (gráfico inferior; media de las células individuales solamente FL1-H) de las células HeLa transfectadas con un vector de expresión de GFP mediante el uso de las dosis indicadas (en µL) de LIPOFECTAMINE® 3000 solo (LF3K), LIPO-FECTAMINE® 2000 (LF2K), un péptido de acuerdo con una modalidad (p4) o LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con un péptido de acuerdo con una modalidad (LF3K+péptido). La presencia del péptido 1 en presencia de una formulación de agregado lipídico catiónico (por ejemplo, LIPOFECTAMINE® 3000) mejora significativamente la eficacia de la transfección y la expresión de las proteínas.

50 Ejemplo 9. Los péptidos de longitud completa se requieren para la transfección óptima

Los siguientes péptidos se delinearon esquemáticamente en las Figuras 9A, 10A y 11A sintetizados y disueltos en el agua ultrapura como se describe en el Ejemplo 1 para el péptido 1. El péptido A (correspondiente a la región MPP de los péptidos no naturales de la presente descripción) y que tiene la secuencia de péptidos SRRARRSPRESGKKRKRKR (SEQ ID NO. 1); péptido B (correspondiente a la región enlazadora de los péptidos de origen no natural de la presente descripción) y que tiene la secuencia peptídica GGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO. 69); péptido C (correspondiente a la región catiónica de los péptidos no naturales de la presente descripción) y que tiene la secuencia peptídica de CP1 RRRRRRRRRRRR (SEQ ID NO. 82); péptido D (correspondiente a la región enlazadora fusionada a la región catiónica de los péptidos no naturales de la presente descripción) y que tiene la secuencia peptídica GGGSGGGSG-GGSRRRRRRRRRRR (SEQ ID NO. 108); y el péptido E, correspondiente al péptido 1 y que tiene la secuencia SRRARRSPRESGKKRKRKRGGGSGGGSGGGSRRRRRRRRRRR (SEQ ID NO. 89).

65 Las células HepG2, A549 y MDA-MB-231 se sembraron en placas de 24 pocillos y se transfectaron durante 48 horas con 1 µg de pcDNAEF1a/emGFP mediante el uso del reactivo LIPOFECTAMINE® 3000 en combinación con el péptido

5 A, péptido B, péptido C, péptido D, péptido A y B juntos, péptido A y C juntos, péptido A y D juntos, péptido B y C juntos o péptido E o péptido A, péptido B, péptido C, péptido D, péptido A y B juntos, péptido A y C juntos, péptido A y D juntos, péptido B y C juntos o péptido E solo sin un reactivo de transfección de lípidos. Las células se visualizaron mediante el uso de la microscopía fluorescente y la eficacia de la transfección medida por el porcentaje de las células GFP+ y la expresión de la proteína medida por la fluorescencia media por célula se determinó como anteriormente. Los resultados se resumen en las Figuras 9B, 9C, 10B, 10C, 11B y 11C.

10 La Figura 9B representa una serie de imágenes de la fluorescencia para detectar la expresión de GFP en las células HepG2 cultivadas transfectadas con un vector de expresión que codifica el GFP mediante el uso de LIPOFECTAMINE® 3000 en presencia del péptido o la combinación indicada de los péptidos (se muestra en la Figura 9A).

15 La Figura 9C representa dos gráficos de barras que muestran la fluorescencia media por célula (gráfico superior) y la eficacia de la transfección (GFP % + células) en las células HepG2 transfectadas con un vector de expresión que codifica el GFP mediante el uso del LIPOFECTAMINE® 3000 en presencia de uno de los péptidos A - E o la combinación indicada de los péptidos (se muestra en la Figura 9A).

20 La Figura 10A es una representación de un mapa peptídico de varios péptidos o los fragmentos de los péptidos usados en los experimentos representados en las Figuras 10B y 10C en las células A549, en las cuales el péptido A es el péptido MPP solo, el péptido B es el péptido enlazador solo, el péptido C es el péptido catiónico solo, el péptido D es el péptido enlazador fusionado con el péptido catiónico, y el péptido E es un péptido de longitud completa que tiene el péptido D fusionado con el péptido A.

25 La Figura 10B representa una serie de imágenes de la fluorescencia para detectar la expresión de GFP en las células A549 cultivadas transfectadas con un vector de expresión que codifica el GFP transfectado con LIPOFECTAMINE® 3000 en presencia del péptido o la combinación indicada de los péptidos (se muestra en la Figura 10A).

30 La Figura 10C representa dos gráficos de barras que muestran la fluorescencia media por célula (gráfico superior) y la eficacia de la transfección (GFP % + células) en las células A549 transfectadas con un vector de expresión que codifica el GFP mediante el uso de LIPOFECTAMINE® 3000 en presencia de uno de los péptidos A - E o la combinación indicada de los péptidos (se muestra en la Figura 10A).

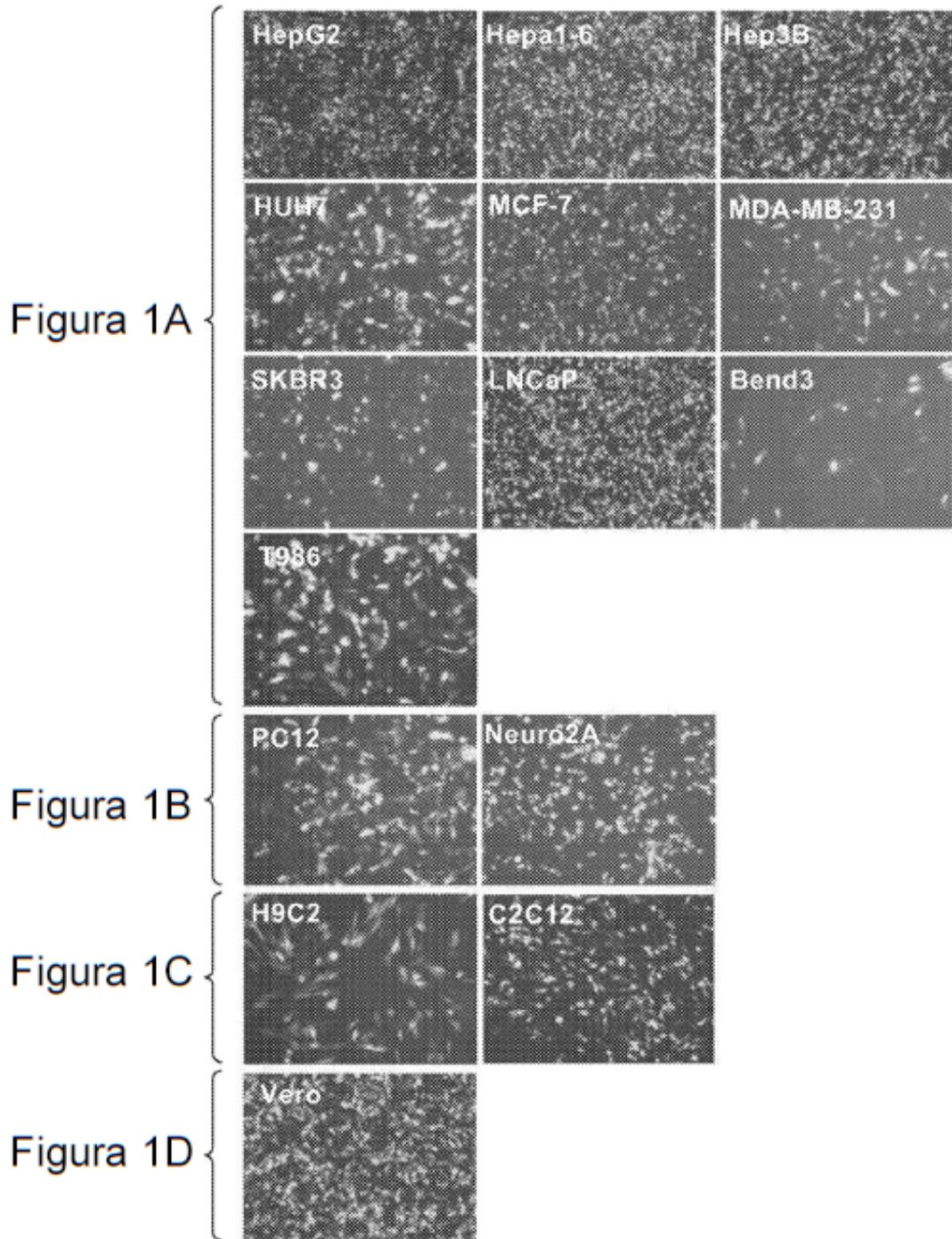
35 La Figura 11A es una representación de un mapa peptídico de varios péptidos o los fragmentos de los péptidos usados en los experimentos representados en las Figuras 11B y 11C en las células MDA-MB-231, en las cuales el péptido A es el péptido MPP solo, el péptido B es el péptido enlazador solo, el péptido C es el péptido catiónico solo, el péptido D es el péptido enlazador fusionado con el péptido catiónico, y el péptido E es un péptido de longitud completa que tiene el péptido D fusionado con el péptido A.

40 La Figura 11B representa una serie de imágenes de la fluorescencia para detectar la expresión de GFP en las células MDA-MB-231 cultivadas transfectadas con un vector de expresión que codifica el GFP transfectado con LIPOFECTAMINE® 3000 en presencia del péptido o la combinación indicada de los péptidos (se muestran en la Figura 11A).

45 La Figura 11C representa dos gráficos de barras que muestran la fluorescencia media por célula (gráfico superior) y la eficacia de la transfección (GFP % + células) en las células MDA-MB-231 transfectadas con un vector de expresión que codifica el GFP mediante el uso del LIPOFECTAMINE® 3000 en presencia de uno de los péptidos indicados A - E o la combinación indicada de los péptidos (se muestra en la Figura 11A).

REIVINDICACIONES

1. Un complejo de transfección que comprende una composición de agregado lipídico que comprende al menos un lípido catiónico, un péptido que tiene la estructura:
- A-L-B,
- en donde;
- A es un péptido penetrante de membrana,
L es un péptido enlazador; y
B es un polipéptido catiónico, y
- una molécula de carga en complejo con el péptido,
- en donde, el lípido catiónico, el péptido y la molécula de carga están presentes en el complejo de transfección en asociación no covalente, y en donde, el péptido A-L-B es una secuencia peptídica seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO. 89-99 y 103.
2. El complejo de transfección de la reivindicación 1, que comprende además un lípido neutro.
3. El complejo de transfección de cualquier reivindicación anterior que comprende además al menos un lípido auxiliar.
4. El complejo de transfección de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el lípido catiónico se selecciona del grupo que consiste en cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), dioleoilfosfatidilcolina (DOPE), 1,2-Bis(oleoiloxi)-3-(4'-trimetilamonio) propano(DOTAP), 1,2-dioleoil-3-(4'-trimetilamonio) butanoil-sn-glicerol (DOTB), éster de 1,2-dioleoil-3-succinil-sn-glicerol colina (DOSC), tetrahidrocloruro de dihidroxil-dimiristilespermina (DHDMS), tetrahidrocloruro de hidroxil-dimiristilespermina (HDMD), butanoato de colesterilo (4'-trimetilamonio) (ChoTB), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), bromuro de 1,2-dioleoil-3-dimetil-hidroxiethylamonio (DORI), bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetil-hidroxiethyl-amonio (DORIE), bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxiethylamonio(DMRIE), cloruro de O,O'-didodecil-N-[p(2-trimetilamonioetiloxi)benzoil]-N,N,N-trimetilamonio, espermina conjugada con uno o más lípidos (por ejemplo, 5-carboxiespermilglicina dioctadecilamida (DOGS), N,Ni,Nii,Niii-tetrametil-N,Ni,Nii, Niii tetrapalmitilespermina (TM -TPS) y dipalmitoilfosfatidiletanolamina 5-carboxiespermilamida (DPPES)), lipopolilisina (polilisina conjugada con DOPE), TRIS(Tris(hidroxiometil)aminometano, trometamina), ácidos grasos conjugados (TF As) y/o péptidos tales como trilisil-alanil-TRIS mono-, di- y tri-palmitato, (3β-[N-(N',N'dimetilaminoetano)-carbamoil] colesterol (DC-Chol), cloruro de N-(a-trimetilamonioacetil)didodecil-D-glutamato (TMAG), bromuro de dimetil dioctadecilamonio (DDAB), 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminin-iotrifluoroacetato(DOSPA) y sus combinaciones.
5. Uso *in vitro* de un complejo de transfección de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para potenciar el transporte de una molécula de carga a las células seleccionadas del grupo que consiste en 3T3, 4T1, A431, A549, ACHN, bEnd.3, BJ, BT-549, C2C12, C6, Caco-2, Caki-1, CHO-K1, CHO-S, COLO 205, COS-7, DU 145, H460, H9c2, HCC1937, HCT116, HEK 293, HeLa, Hep-3B, Hepa 1-6, HepG2, Hs 578T, cHT29, Huh-7, Jurkat, K-562, L6, L929, LNCaP, MCF 10A, MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-468, MDCK, Neuro-2a, NCI-H23, NCI-H460, P19, PANC-1, PC12, RAW264.7, RBL-2H3, RD, Saos-2, SH-SY5Y, SK-BR-3, SK-MEL-28, SK-N-SH, SK-OV-3, SW480, SW620, T98G, U2OS, U937, o Vero.
6. El complejo de transfección de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o el uso de la reivindicación 5, en donde dicha molécula de carga es un ácido nucleico, opcionalmente en donde dicha molécula de carga es una molécula de ADN o un ARN.
7. Un método *in vitro* para administrar un polianión en una célula en donde el método comprende:
- formar un complejo de transfección que comprende una composición de agregado lipídico que comprende uno o más lípidos catiónicos y uno o más lípidos neutros,
poner en contacto el agregado lipídico con un polianión, en donde, el polianión está en complejo con un péptido como se describe en la reivindicación 1, e
incubar una célula con el complejo de transfección, en donde, uno o más lípidos catiónicos y uno o más lípidos neutros y el polianión están presentes en el complejo de transfección en asociación no covalente.



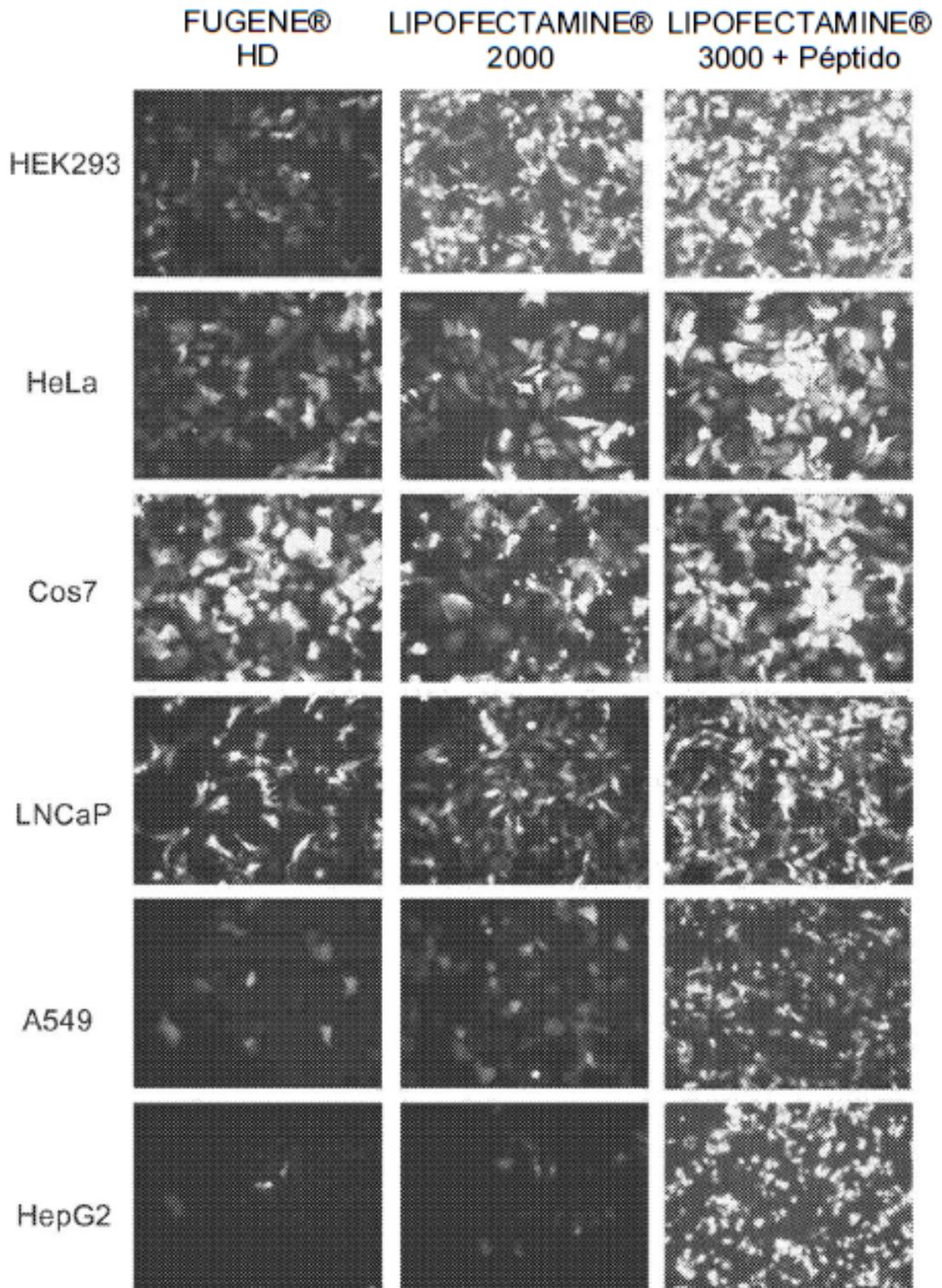


Figura 2

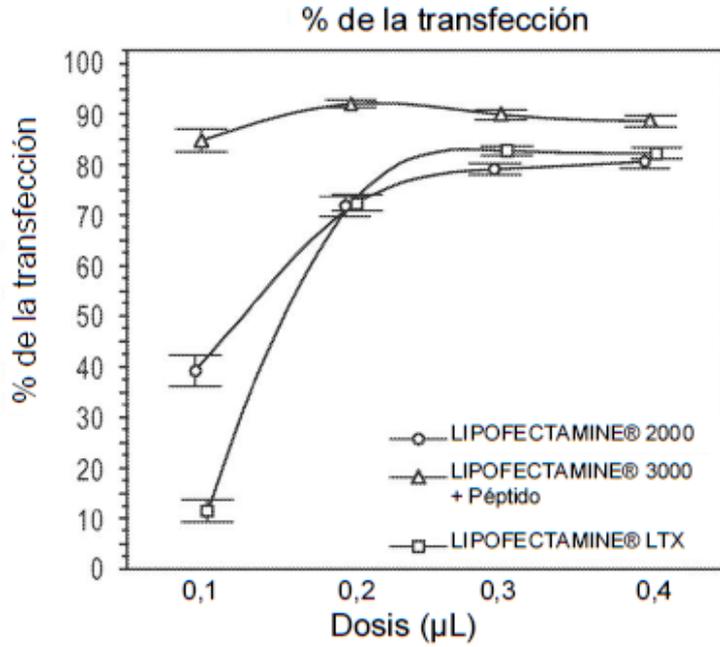


Figura 3A

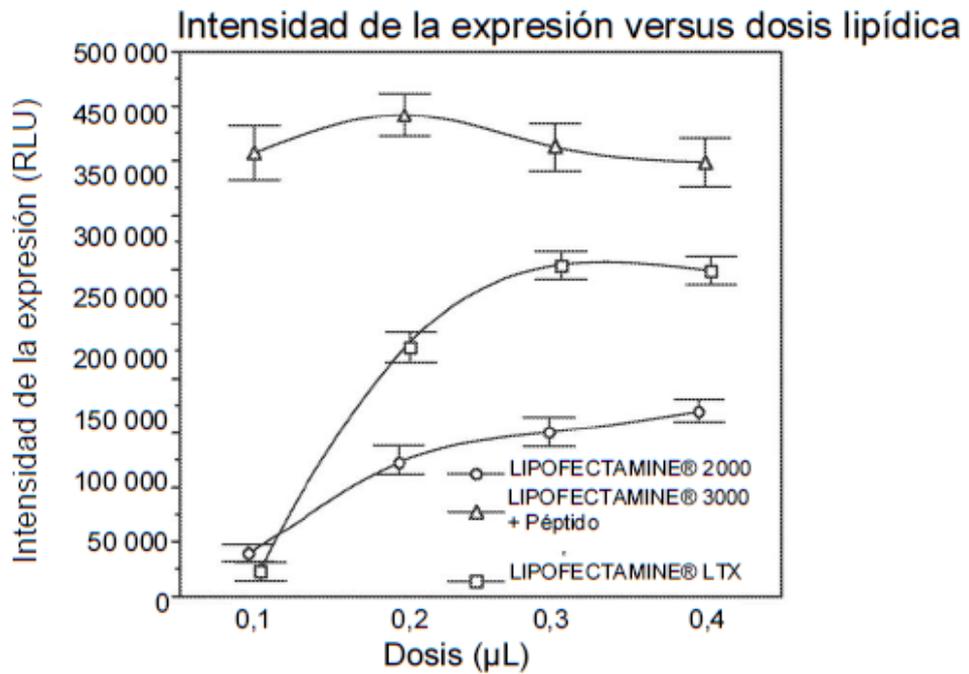


Figura 3B

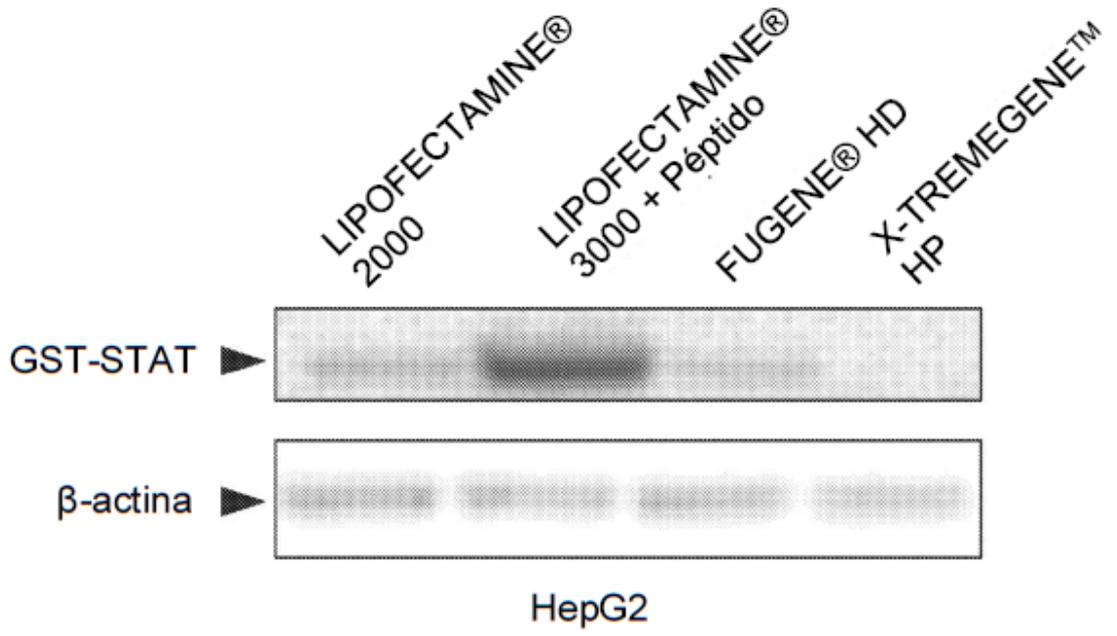


Figura 4

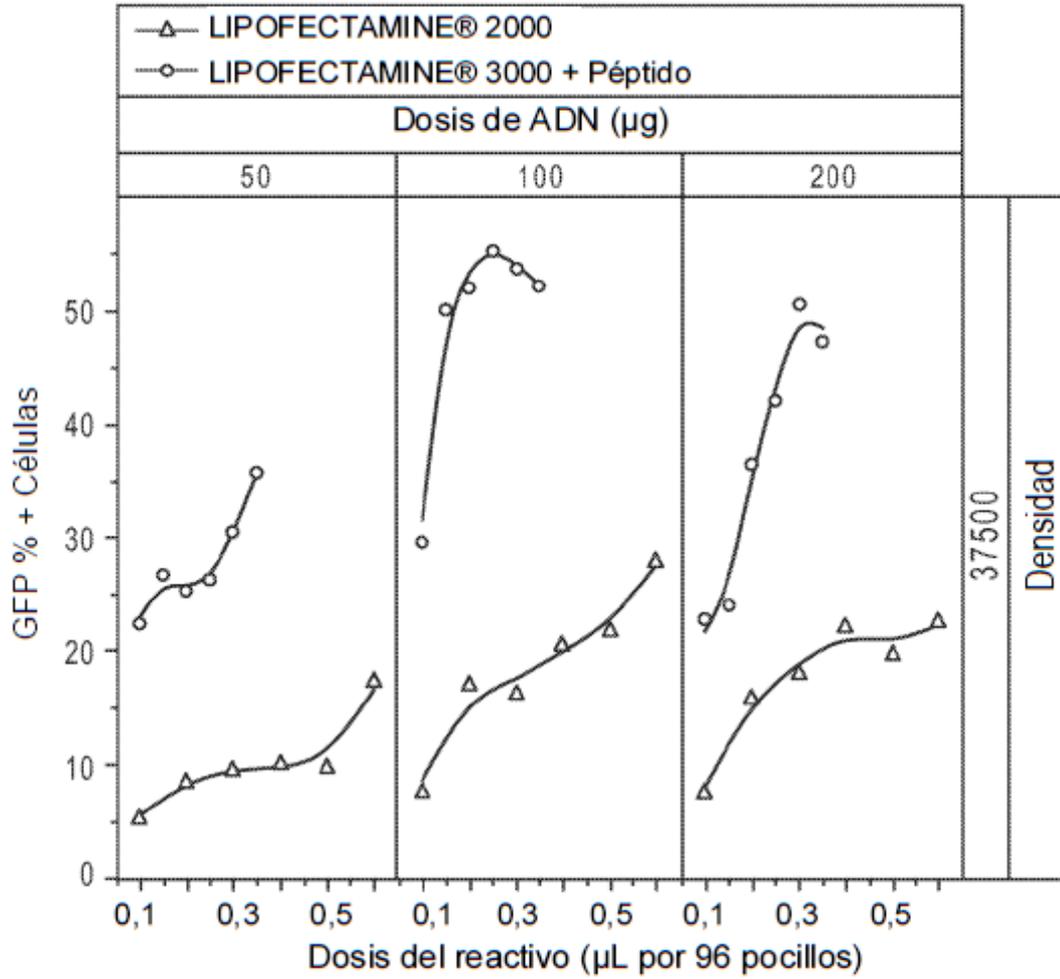


Figura 5A

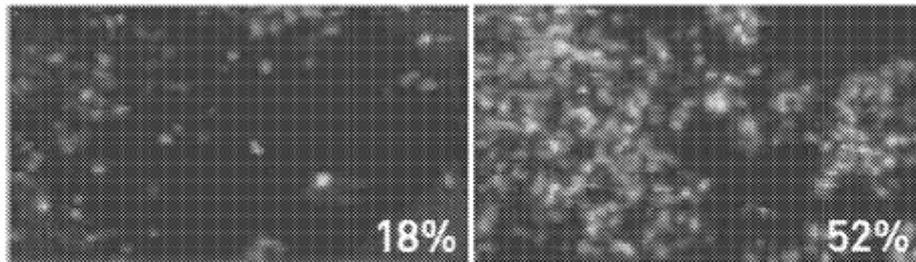


Figura 5B

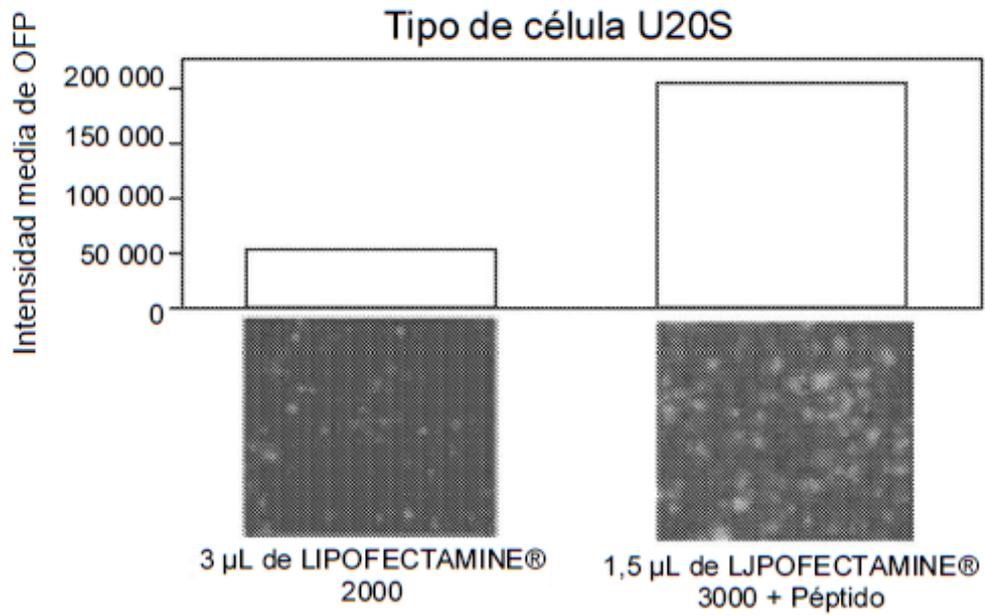


Figura 6A

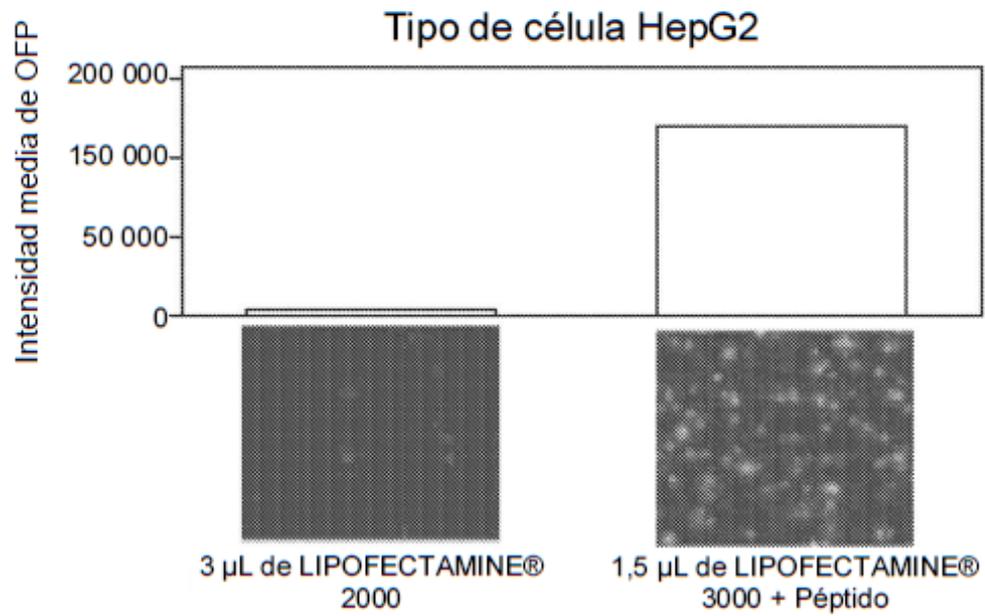


Figura 6B

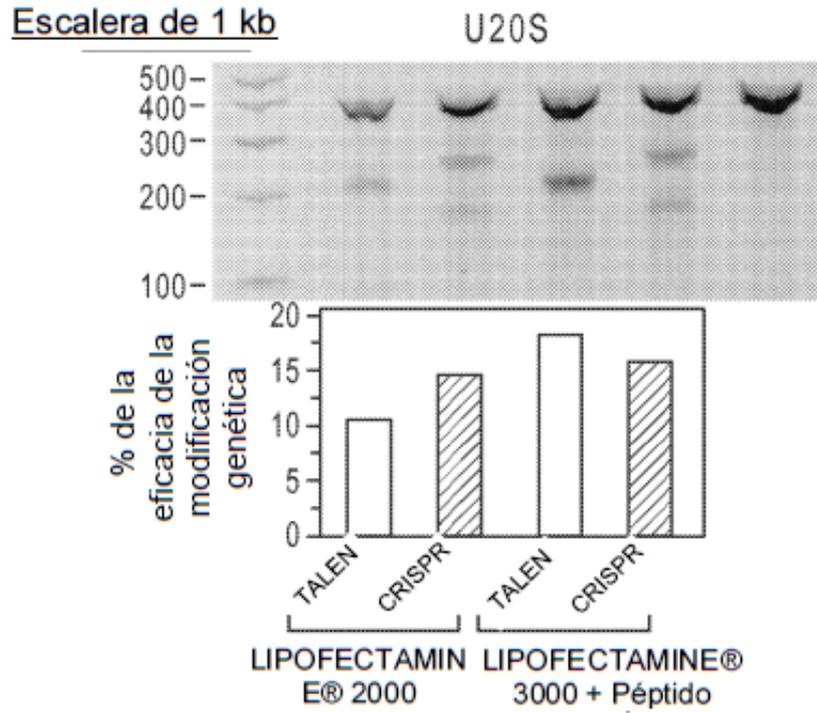


Figura 7A

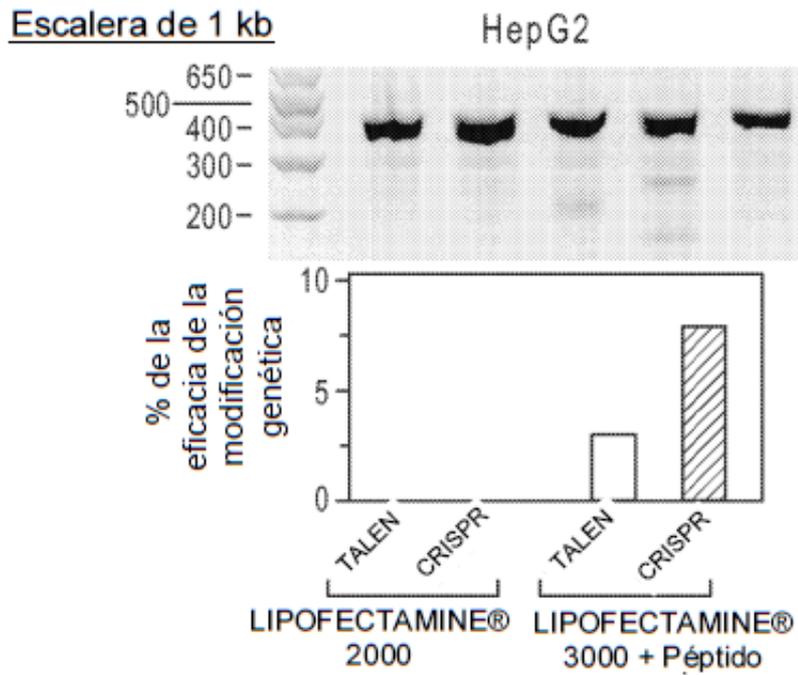


Figura 7B

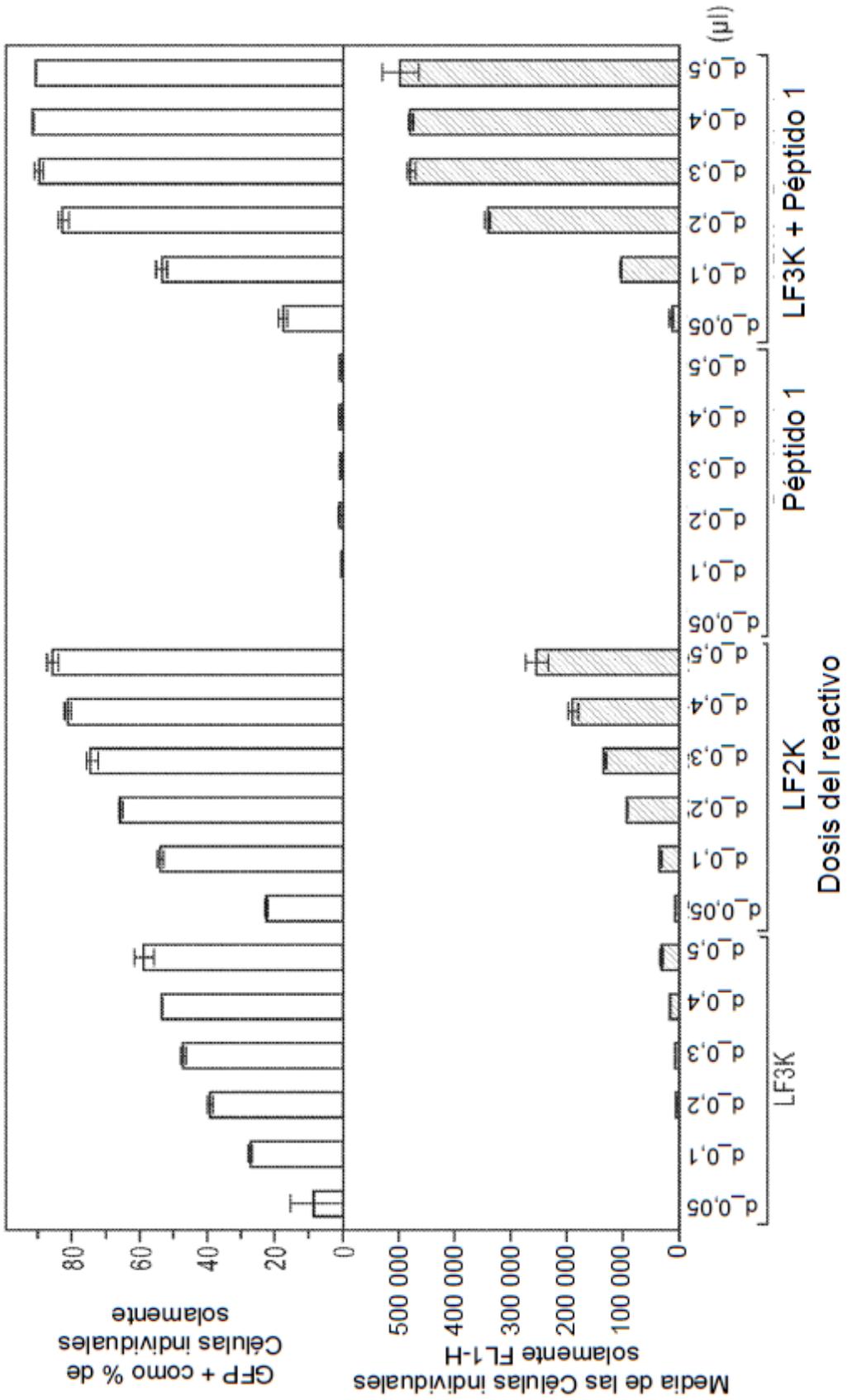


Figura 8

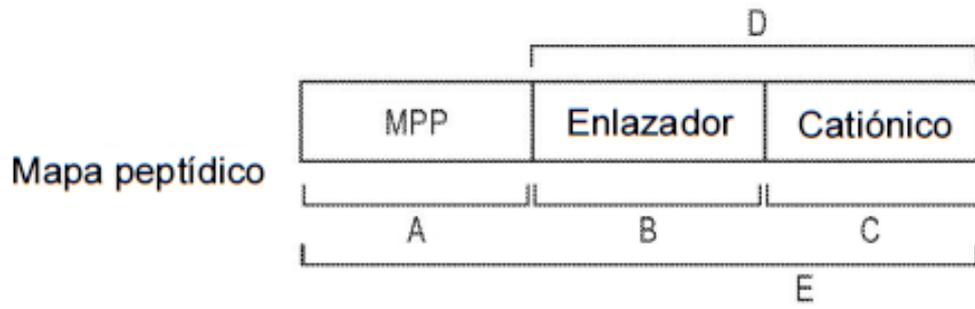


Figura 9A

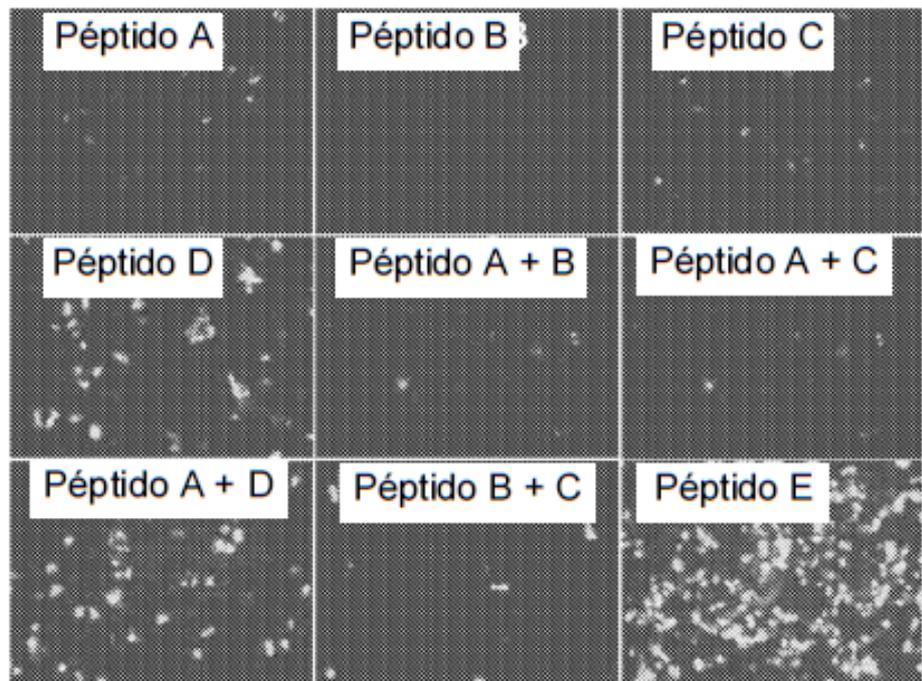


Figura 9B

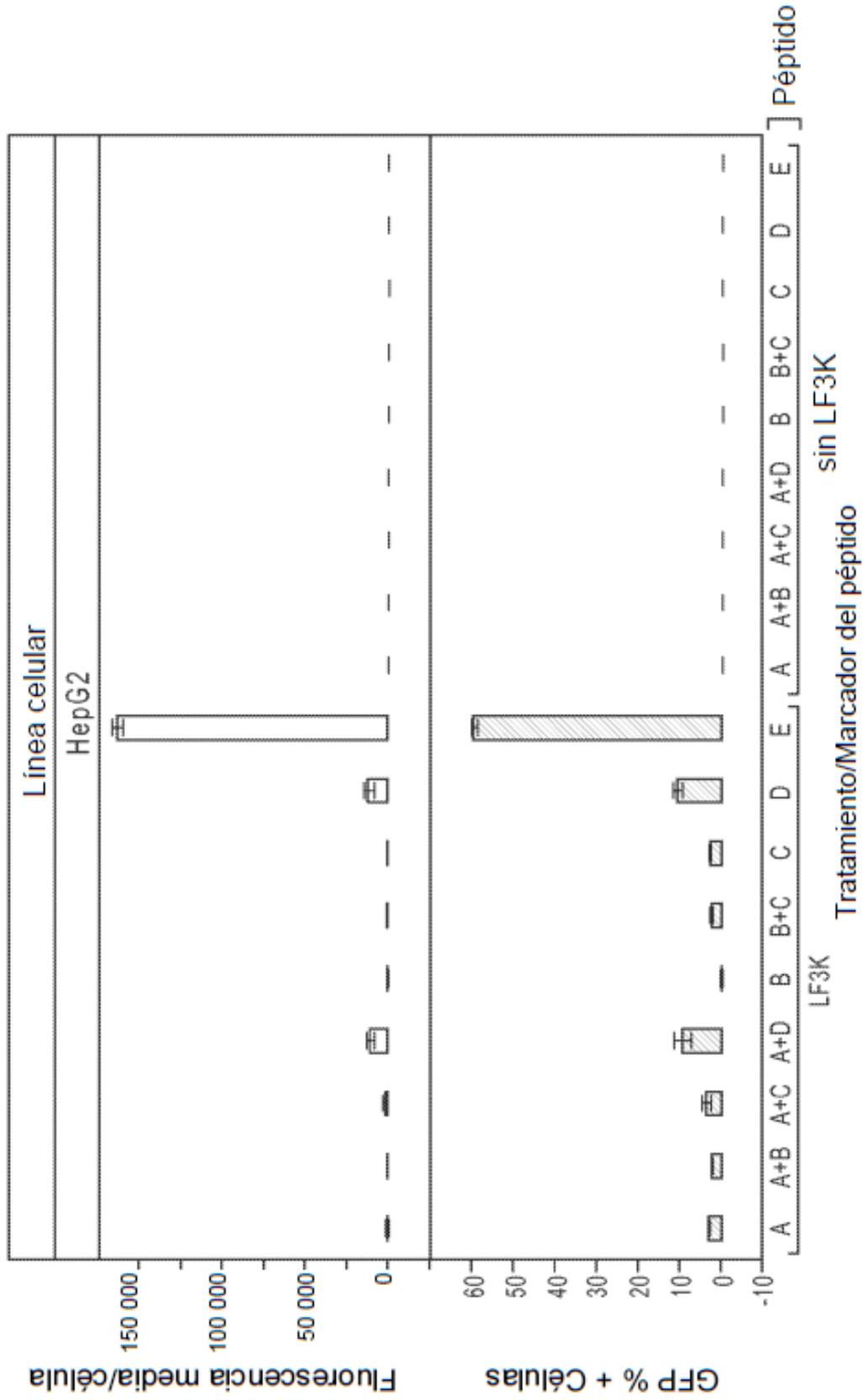


Figura 9C

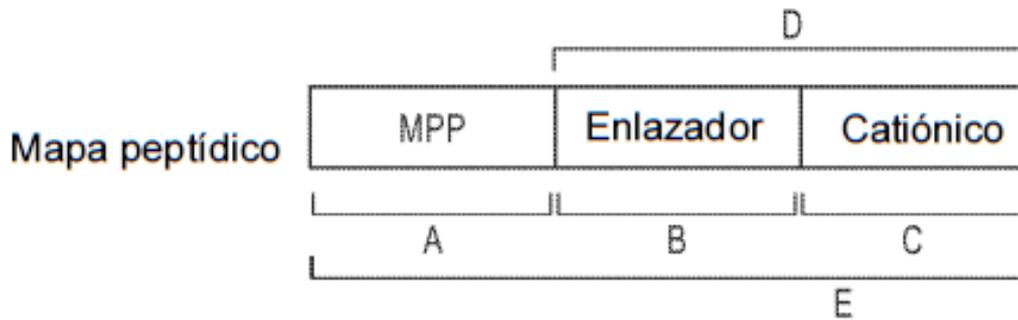


Figura 10A

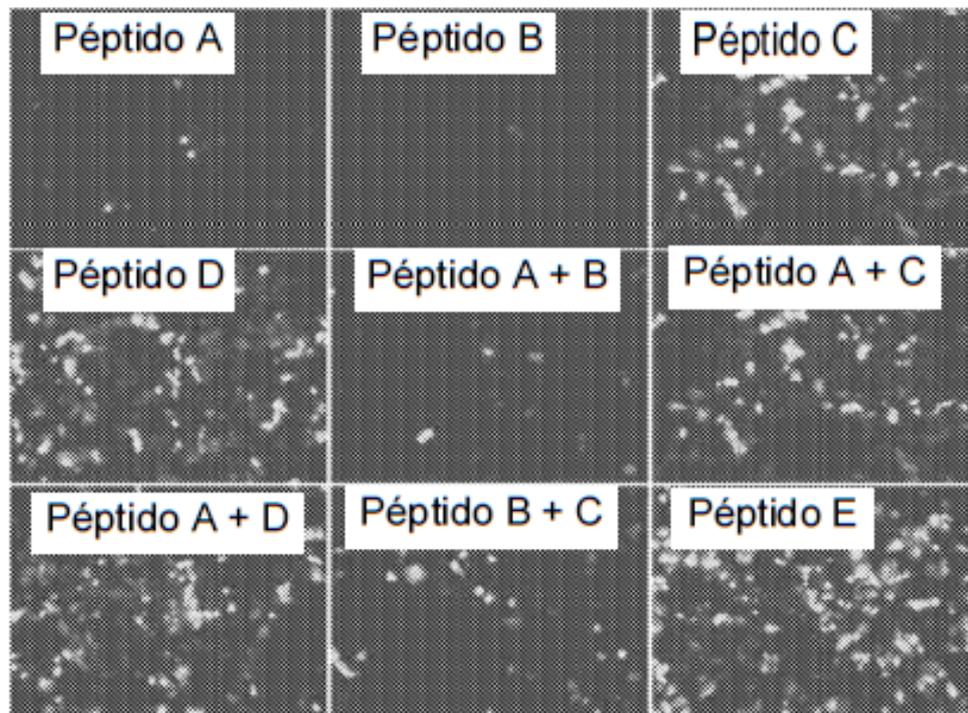


Figura 10B

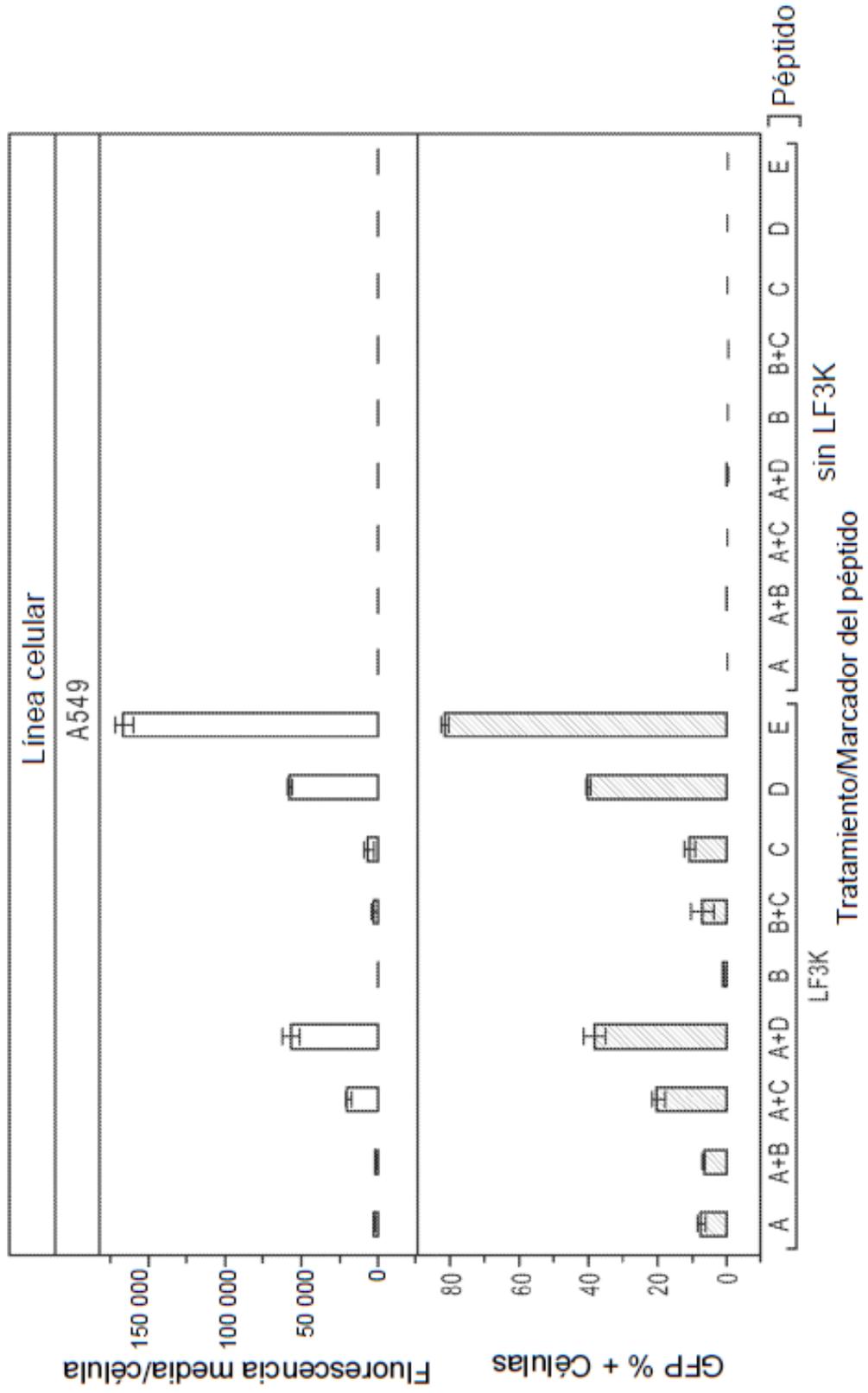


Figura 10C

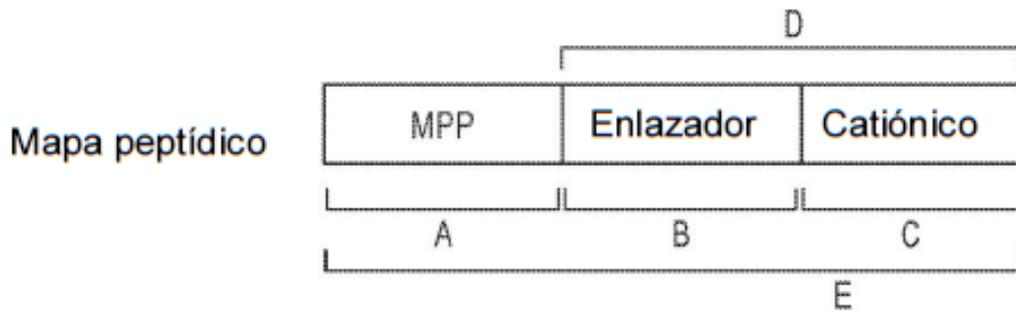


Figura 11A

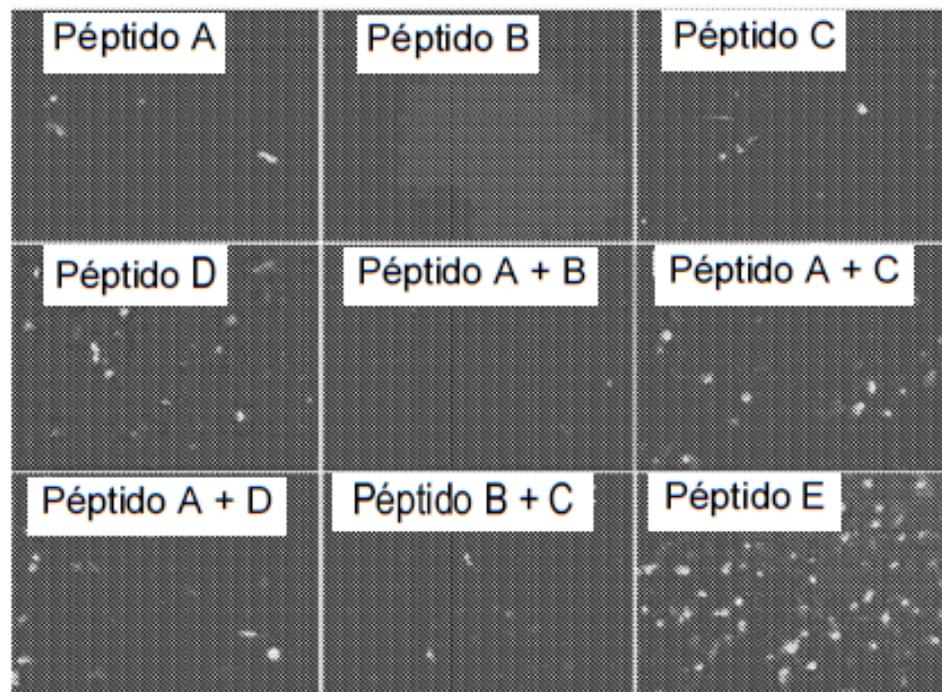


Figura 11B

