

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 537**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01968868 .8**
- 96 Fecha de presentación: **13.09.2001**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1320387**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.06.2003**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas para la administración sostenida de péptidos**

30 Prioridad:
13.09.2000 US 232188 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.09.2012

73 Titular/es:
**GlaxoSmithKline LLC
One Franklin Plaza 200 North 16th Street
Philadelphia, PA 19102, US**

72 Inventor/es:
GEFTER, Malcolm L.

74 Agente/Representante:
Izquierdo Faces, José

ES 2 387 537 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas para la administración sostenida de péptidos

5 **Solicitudes relacionadas**

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud provisional de EE.UU. Nº 60/232.188, presentada el 13 de septiembre de 2000.

10 **Antecedentes de la invención**

[0002] Durante los últimos años se han desarrollado sistemas de liberación sostenida en base a una amplia gama de tecnologías, dirigidas a la administración de una amplia variedad de agentes farmacéuticos. Los formatos físicos para tales sistemas incluyen el uso de micropartículas, placas o sistemas macroscópicos similares diseñados para implantes, geles y emulsiones, y otras preparaciones concebidas para mantener el agente activo en el sistema de administración durante un período prolongado de tiempo.

[0003] En el documento US6054555 se describe una composición de liberación sostenida en la que el péptido LHRH está unido a un portador macromolecular de poli(ácido aspártico) o poli(ácido glutámico).

[0004] En el documento WO 98/25642 se describe una composición de liberación sostenida en la que un péptido LHRH está unido a una macromolécula aniónica, en concreto, carboximetilcelulosa.

[0005] Generalmente se entiende que el mecanismo de liberación para los sistemas de liberación sostenida de tipo matriz se produce por difusión obstaculizada del agente activo a través de la matriz de soporte, o por erosión de la matriz a lo largo del tiempo lo que da como resultado la liberación del agente activo incorporado. Estos procesos no son mutuamente excluyentes, y ambos mecanismos pueden estar activos simultáneamente en el caso de un sistema dado.

[0006] En los últimos años se han utilizado dispositivos de liberación sostenida para la administración de agentes farmacéuticos proteínicos, principalmente como resultado de la disponibilidad de proteínas recombinantes que se han desarrollado para aplicaciones terapéuticas en una amplia variedad de estados patológicos. El desarrollo de tales sistemas crea mayores dificultades a superar que en el caso de los fármacos de bajo peso molecular y de las sustancias farmacéuticamente activas, ya que las proteínas tienen intrínsecamente sólo estabilidad conformacional marginal, y con frecuencia pueden ser susceptibles a condiciones o procesos que dan como resultado la inactivación o la desnaturalización. A diferencia de la degradación o el deterioro de los productos farmacéuticos de bajo peso molecular, las alteraciones estructurales en las proteínas que conducen a la inactivación no tienen por qué implicar cambios en la estructura covalente de la proteína, sino que pueden ser exclusivamente la consecuencia de una alteración de un amplio sistema de interacciones no-covalentes y/o una alteración de los enlaces disulfuro que son responsables del mantenimiento de la estructura tridimensional nativa de la proteína. Esta mayor labilidad de las proteínas, en comparación con los fármacos de bajo peso molecular y otras sustancias farmacéuticamente activas, crea la necesidad de formulaciones capaces de administrar proteínas/péptidos *activos in vivo* de forma continua durante períodos prolongados de tiempo.

45 **Resumen de la invención**

[0007] La presente invención proporciona composiciones tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas. La composición comprende un complejo insoluble en agua que comprende un péptido farmacéuticamente activo, y una pluralidad de ligandos para el péptido, que permiten la administración sostenida del péptido *in vivo* tras la administración del complejo. Por consiguiente, la composición de la presente invención puede permitir la administración continua de un péptido a un sujeto durante períodos prolongados de tiempo, por ejemplo, una semana o un mes. Además, la asociación del péptido y la pluralidad de ligandos en un complejo estable completamente ensamblado permite cargar altas concentraciones del péptido en la composición.

[0008] Por consiguiente, la invención se caracteriza por una composición que incluye una pluralidad de moléculas peptídicas y una pluralidad de ligandos para el péptido, estando unidos la pluralidad de ligandos; en la que el péptido y la pluralidad de ligandos forman conjuntamente un complejo insoluble en agua. Cada uno de los ligandos es un compuesto peptídico. El complejo puede estar en forma de sólido (por ejemplo, una pasta, gránulos, un polvo, o un liofilizado) o la forma en polvo del complejo puede estar pulverizada de manera suficientemente fina para formar suspensiones líquidas estables o dispersiones semisólidas.

[0009] La pluralidad de ligandos están unidos a través de una macromolécula portadora. La pluralidad de ligandos (o subcombinaciones de los mismos) pueden estar fijados covalentemente a la macromolécula portadora, a través de interacciones electrostáticas, a través de interacciones hidrófobas, o una combinación de las mismas.

5 **[0010]** El péptido está seleccionado del grupo que consiste en insulina, eritropoyetina (EPO), hormona del crecimiento, bradiquinina, hormona paratiroidea, hormona adenocorticotrópica, calcitonina, vasopresina, angiotensina, desmopresina, hormona liberadora de la hormona luteinizante, somatostatina, glucagón, somatomedina, oxitocina, gastrina, secretina, hormona estimuladora de los melanocitos, beta-endorfina, encefalina, neurotensina, hormona liberadora tiroidea, factor estimulador de los macrófagos, CCR-5, factor liberador de la hormona del crecimiento (GRF), RGD, factor de necrosis tumoral (TNF), interleucinas (u otras citocinas) o miméticos de péptidos de los mismos. En otra forma de realización, el péptido es un antagonista de LHRH que tiene la estructura Ac-D-Nal-4-CI-D-Phe-D-Pal-Ser-N-Me-Tyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala, el agonista de LHRH Leuprolida que tiene la estructura pGlu- His- Trp- Ser- Tyr- D- Leu- Leu- Arg- Pro(etilamida)-Gly, o el antagonista de LHRH Cetrorelix que tiene la estructura Ac-D-Nal-4-CI-D-Phe-D-Pal-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala.

10 **[0011]** En una forma de realización preferente, la composición proporciona una administración sostenida del péptido a un sujeto por lo menos durante una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, cinco semanas, o más, después de administrar la composición al sujeto.

15 **[0012]** En otro aspecto, la presente invención se caracteriza por una composición que incluye un péptido; una pluralidad de ligandos para el péptido, estando cargado cada uno de los ligandos negativamente o positivamente; y una macromolécula portadora iónica que tiene una carga eléctrica opuesta a la carga de cada uno de los ligandos; en la que la pluralidad de ligandos están unidos a través de la macromolécula y en la que el péptido, la pluralidad de ligandos, y la macromolécula portadora forman conjuntamente un complejo insoluble en agua. Cada uno de los ligandos es peptídico. Cada uno de los ligandos es una molécula peptídica y cada uno de los ligandos comprende una secuencia de aminoácidos que lleva una carga electrónica neta, por ejemplo, una carga positiva o negativa.

20 **[0013]** En una forma de realización, cada uno de los ligandos es catiónico y la macromolécula portadora es aniónica, por ejemplo, un polialcohol aniónico, un polisacárido aniónico, un aminoácido polianiónico, ácido algínico o una sal del mismo, ácido poliglucorónico o sales del mismo, carragenina, poli(acrilato), poli(metacrilato), o glicolato de almidón.

25 **[0014]** En otra forma de realización, cada uno de los ligandos es aniónico y la macromolécula portadora es catiónica, por ejemplo, poli-L-lisina; poli-L-arginina; una poli(alilamina); una poli(vinilamina); una poli(etilenimina); una poli(alilamina) N-alquilada, una poli(vinilamina) N-alquilada; una poli(emilenimina) N-alquilada; dietilaminoetil dextrano; dietilaminoetilcelulosa; o poli(d-glucosamina).

30 **[0015]** En aún otro aspecto, la invención se caracteriza por una composición que incluye un péptido, una pluralidad de ligandos para el péptido, estando cargado cada uno de los ligandos positivamente, y carboximetilcelulosa; en la que la pluralidad de ligandos están unidos a través de la carboximetilcelulosa y en la que el péptido, la pluralidad de ligandos, y la carboximetilcelulosa forman conjuntamente un complejo insoluble en agua.

35 **[0016]** En un aspecto adicional, la invención se caracteriza por un procedimiento para preparar una composición.

40 **[0017]** El complejo insoluble en agua formado puede esterilizarse adicionalmente, por ejemplo, mediante calor, irradiación gamma o irradiación con haz de electrones. Preferentemente, el complejo insoluble en agua se forma utilizando procedimientos asépticos, que también pueden utilizarse como otro medio de esterilización.

45 **[0018]** En otro aspecto, la invención puede utilizarse en un procedimiento para tratar a un sujeto con una afección tratable con un péptido administrando al sujeto una composición que incluye el péptido y una pluralidad de ligandos para el péptido, estando unidos la pluralidad de ligandos; en la que el péptido y la pluralidad de ligandos forman conjuntamente un complejo insoluble en agua. Preferentemente, la composición se esteriliza, por ejemplo, mediante irradiación (por ejemplo, irradiación gamma) o irradiación con haz de electrones, antes de la administración *in vivo*.

50 **[0019]** Otras características y ventajas de la invención se pondrán de manifiesto a partir de la siguiente descripción detallada y, a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

55 **[0020]**

60 Las figuras 1A y 1B son representaciones esquemáticas de una composición comparativa y una composición de la invención. La figura 1A representa una composición en la que la pluralidad de ligandos están unidos directamente el uno al otro. La figura 1B representa la composición de la invención en la que la pluralidad de ligandos están unidos a través de una macromolécula portadora.

65 Las figuras 2A y 2B son representaciones esquemáticas de una forma de realización de la invención y una forma de realización comparativa. La figura 2A representa la forma de realización en la que cada uno de la pluralidad de ligandos está cargado positivamente y la macromolécula portadora está cargada negativamente. La pluralidad de ligandos están unidos indirectamente a través de la macromolécula

portadora. La figura 2B representa la forma de realización de referencia en la que cada uno de la pluralidad de ligandos está modificado por ingeniería genética para contener una cadena de poli-L-lisina (que tiene una carga neta positiva) o una cadena de poli-L-glutamato (que tiene una carga neta negativa). La pluralidad de ligandos están unidos directamente.

5

Descripción detallada de la invención

[0021] La presente invención proporciona composiciones que comprenden un complejo insoluble en agua que comprende una proteína o un péptido farmacéuticamente activo, y una pluralidad de ligandos para el péptido, que permiten la administración sostenida del péptido *in vivo* tras la administración del complejo. Las ventajas de las composiciones de la presente invención incluyen la capacidad para administrar un péptido, sistémicamente o localmente, durante períodos prolongados de tiempo (por ejemplo, un mes) y la capacidad de cargar altas concentraciones de un péptido en la composición.

[0022] Por consiguiente, la invención se caracteriza por una composición que incluye un péptido y una pluralidad de ligandos para el péptido, estando unidos la pluralidad de ligandos; en la que el péptido y la pluralidad de ligandos forman conjuntamente un complejo insoluble en agua.

[0023] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente y pretenden incluir compuestos que comprenden dos o más restos de aminoácidos unidos por enlaces amida. Tales compuestos pueden ser biomoléculas naturales, tales como proteínas y hormonas peptídicas, variantes de secuencias de aminoácidos de una biomolécula natural, o péptidos sintéticos. En una forma de realización, el péptido incluye los veinte aminoácidos naturales o cualquiera de ellos. El péptido también puede incluir uno o más restos de D-aminoácidos y/o uno o más restos de aminoácidos que no son naturales. Ejemplos de péptidos incluyen insulina, eritropoyetina (EPO), hormona del crecimiento, bradicinina, hormona paratiroidea, hormona adenocorticotrópica, calcitonina, vasopresina, angiotensina, desmopresina, hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), somatostatina, glucagón, somatomedina, oxitocina, gastrina, secretina, hormona estimuladora de los melanocitos, beta-endorfina, encefalina, neurotensina, hormona liberadora tiroidea, factor estimulador de los macrófagos, CCR-5 soluble, factor de necrosis tumoral (TNF), factor liberador de la hormona del crecimiento (GRF), GRD, receptor de TNF-9 soluble, interleucina, y otras citocinas o miméticos de citocinas.

[0024] El término "péptido" pretende abarcar adicionalmente análogos de péptidos, derivados de péptidos y peptidomiméticos que imitan la estructura química de un péptido compuesto de aminoácidos de origen natural. La expresión "análogo de péptido" tal como se utiliza en el presente documento, pretende incluir moléculas que imitan la estructura química de un péptido y conservan las propiedades funcionales del péptido. Ejemplos de análogos de péptidos incluyen péptidos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales. La expresión "derivado de péptido" tal como se utiliza en el presente documento, pretende incluir péptidos en los que una cadena lateral de aminoácido, la cadena principal del péptido, o el extremo terminal carboxilo o amino han sido derivatizados (por ejemplo, compuestos peptídicos con enlaces amida metilados).

[0025] El término "peptidomimético" tal como se utiliza en el presente documento pretende incluir los compuestos peptídicos en los que la cadena principal del péptido está sustituida con una o más moléculas de benzodiazepina (véase, por ejemplo, James, G.L. *et al.* (1993) Science 260:1937-1942), péptidos "inversos" en los que todos los L-aminoácidos están sustituidos con los correspondientes D-aminoácidos, péptidos "retro-inversos" (véase la patente de EE.UU. N° 4.522.752 de Sisto) en los que la secuencia de aminoácidos está invertida ("retro") y todos los L-aminoácidos están sustituidos con D-aminoácidos ("inverso") y otros isómeros, tales como miméticos de la cadena principal del péptido (es decir, enlace amida), que incluyen modificaciones del nitrógeno de la amida, el carbono α , el carbonilo de la amida, la sustitución completa del enlace amida, extensiones, deleciones o entrecruzamientos de la cadena principal. Se conocen varias modificaciones de la cadena principal del péptido, que incluyen ψ [CH₂S], ψ [CH₂NH], ψ [CSNH₂], ψ [NHCO], ψ [COCH₂], y ψ [(E) o (Z) CH=CH]. En la nomenclatura utilizada anteriormente, ψ indica la ausencia de un enlace amida. La estructura que sustituye al grupo amida se especifica dentro de los corchetes. Otras posibles modificaciones incluyen una sustitución N-alquilo (o arilo) (ψ [CONR]), el entrecruzamiento de la cadena principal para construir lactamas y otras estructuras cíclicas, y otros derivados que incluyen derivados hidroximetilo C-terminales, derivados modificados en O y derivados modificados en el extremo N terminal que incluyen amidas sustituidas tales como alquilamidas e hidrazidas.

[0026] Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "péptido farmacéuticamente activo" pretende incluir un péptido que presenta una actividad farmacológica, ya sea en su forma actual o tras su procesamiento *in vivo* (es decir, los péptidos farmacéuticamente activos incluyen péptidos con actividad farmacológica constitutiva y péptidos en forma de "profármaco" que tiene que ser metabolizado o procesado de alguna manera *in vivo* después de la administración con el fin de presentar actividad farmacológica).

[0027] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ligando" incluye una molécula que tiene la capacidad para unirse o asociarse con un péptido. El ligando es una molécula peptídica. El ligando puede ser un ligando natural para el péptido (por ejemplo, si el péptido es un antagonista de LHRH o insulina, el ligando puede ser un receptor de LHRH o un receptor de insulina, respectivamente) o un ligando artificial para el péptido, tal como un

65

fragmento de un ligando natural.

[0028] Los ligandos están unidos indirectamente. Están unidos a una macromolécula portadora, a través de interacciones covalentes, a través de interacciones iónicas, a través de interacciones hidrófobas, o una combinación de las mismas. Por consiguiente, el ligando también incluye una región que le permitirá interactuar con otro ligando o con una macromolécula portadora.

[0029] Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "agente de entrecruzamiento" incluye cualquier agente que pueda utilizarse para unir los ligandos de la invención. Agentes de entrecruzamiento preferentes son los entrecruzadores heterobifuncionales, que pueden utilizarse para unir las proteínas de una forma progresiva. En la técnica se conocen una amplia variedad de agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales, que incluyen succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), aminobenzoato de N-succinimidil (4-yodoacetilo) (SIAB), butirato de succinimidil 4-(p-maleimidofenil) (SMPB), hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC); 4-succinimidil-oxicarbonil-a-metil-a-(2-piridilditio)-tolueno (SMPT), N-succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil 6-[3-(2-piridilditio)propionato] hexanoato (LC-SPDP).

[0030] Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "macromolécula portadora" pretende incluir cualquier macromolécula que pueda utilizarse para unir los ligandos de la invención. Preferentemente, la macromolécula tiene un peso molecular de por lo menos 5 kDa, más preferentemente 10 kDa. La macromolécula portadora puede comprender una sola especie molecular (por ejemplo, un solo tipo de polímero) o dos o más especies moleculares diferentes (por ejemplo, una mezcla de dos o más tipos de polímeros). La expresión macromolécula portadora incluye macromoléculas portadoras aniónicas que están cargadas negativamente, así como macromoléculas portadoras catiónicas que están cargadas positivamente.

[0031] Los péptidos, ligandos y portadores macromoleculares iónicos que forman parte de la presente invención se definen en las reivindicaciones.

[0032] La macromolécula portadora está seleccionada de entre un polialcohol aniónico, polisacáridos aniónicos, poli(alilaminas), poli(vinilaminas), poli(etileneiminas), poli(alilaminas) N-alquiladas, poli(vinilaminas) N-alquiladas o poli(etileneiminas) N-alquiladas. Ejemplos de macromoléculas portadoras aniónicas específicas incluyen carboximetilcelulosa, algina, alginato, polímeros acrílicos aniónicos, gomas de xantano, almidón glicolato sódico, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, así como derivados aniónicos de carragenina, derivados aniónicos del ácido poligalacturónico. Ejemplos de polímeros catiónicos incluyen poli-L-lisina, poli-L-arginina y otros polímeros de aminoácidos básicos.

[0033] En una forma de realización preferente, la composición proporciona una administración sostenida del péptido a un sujeto después de administrar la composición al sujeto. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "administración sostenida" pretende referirse a la administración sostenida del péptido *in vivo* durante un período de tiempo tras la administración, preferentemente durante por lo menos varios días (por ejemplo, 7, 8, 9, 10, o más días); una, dos, tres, o cuatro semanas, o uno, dos, tres, de cuatro meses. La administración sostenida del péptido puede demostrarse, por ejemplo, por el efecto terapéutico continuado del péptido a lo largo del tiempo (por ejemplo, para un análogo de LHRH, la administración sostenida del análogo puede demostrarse por la supresión continuada de la síntesis de testosterona a lo largo del tiempo). De manera alternativa, la administración sostenida del péptido puede demostrarse detectando la presencia del péptido o un metabolito del péptido *in vivo* a lo largo del tiempo.

[0034] En las subsecciones siguientes se describen adicionalmente diversos aspectos de la invención.

I. Péptidos

[0035] Puede utilizarse una variedad de péptidos farmacéuticamente activos en las composiciones de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

[0036] El péptido tiene la capacidad de formar un complejo insoluble en agua con el ligando y la macromolécula portadora tras la combinación del péptido y el ligando y la macromolécula portadora.

[0037] Los péptidos a utilizar en las composiciones de la presente invención pueden aislarse a partir de fuentes naturales (por ejemplo, purificados mediante cromatografía o cristalización), pueden comprarse, si están disponibles en el mercado, o pueden prepararse mediante cualquier procedimiento adecuado para la síntesis de péptidos (de manera progresiva o convergente), que incluye la síntesis química en fase de solución y en fase sólida, o una combinación de estos enfoques. Los procedimientos para sintetizar químicamente péptidos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) y Grant, G.A (ed.). Synthetic Peptides: A User's Guide, W.H. Freeman and Company, Nueva York (1992). En el mercado hay disponibles sintetizadores automatizados de péptidos (por ejemplo, para moléculas pequeñas).

[0038] En otra forma de realización, los péptidos a utilizar en las composiciones de la presente invención se producen mediante técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, el péptido deseado puede expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insectos (utilizando vectores de expresión de baculovirus) células de levadura o células de mamífero. Células hospedadoras adecuadas se analizan adicionalmente en Goeddel Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). De manera alternativa, el vector de expresión recombinante que codifica el péptido deseado puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo, utilizando secuencias reguladoras del promotor de T7 y la polimerasa de T7.

II. Ligandos

[0039] Los ligandos que pueden utilizarse en la presente invención incluyen cualquier molécula peptídica que sea capaz de unirse a un péptido con una constante de unión de 10 mM o menos.

[0040] El ligando puede ser un ligando natural para el péptido o un ligando artificial para el péptido, tal como un fragmento de un ligando natural, o un compuesto sintético.

[0041] Los ligandos de la presente invención puede obtenerse utilizando cualquiera de los numerosos enfoques de los procedimientos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, que incluyen: bibliotecas biológicas; bibliotecas direccionables espacialmente en paralelo en fase sólida o en fase solución; procedimientos de bibliotecas sintéticas que requieren deconvolución; el procedimiento de biblioteca "una perla, un compuesto"; y procedimientos de bibliotecas sintéticas que utilizan la selección por cromatografía de afinidad. El enfoque de la biblioteca biológica se limita a las bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a los péptidos, oligómeros no péptidos o bibliotecas de moléculas pequeñas de los compuestos (Lam, K.S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145).

[0042] En la técnica pueden encontrarse ejemplos de procedimientos para la síntesis de bibliotecas moleculares, por ejemplo en: DeWitt *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:6909; Erb *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann *et al.* (1994). *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho *et al.* (1993) *Science* 261:1303; Carrell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carrell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; y en Gallop *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233.

[0043] El ligando es un compuesto peptídico. Por consiguiente, pueden utilizarse bibliotecas que comprendan una multiplicidad de posibles ligandos peptídicos para identificar los ligandos que se unen a un péptido de interés (es decir, el péptido a utilizar en la composición de la invención). Una biblioteca que comprende una multiplicidad de ligandos peptídicos puede formarse mediante uno cualquiera de varios procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una forma de realización, se sintetiza una multiplicidad de moléculas de ácido nucleico que codifican una multiplicidad de ligandos peptídicos aleatorios y las moléculas de ácido nucleico se introducen en un vector que permite la expresión de la biblioteca de ligandos peptídicos codificados. Un ejemplo de una biblioteca de este tipo es una biblioteca "externa" en la que la biblioteca de ligandos peptídicos se expresa en una proteína de superficie de un hospedador, tal como una biblioteca de "expresión en fagos" (véase, por ejemplo, Smith, G.P. (1985) *Science* 228:1315-1317; Parmley, S.F. y Smith, G.P. (1988) *Gene* 73:305-318; y Cwirla, S. *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382). Tal como se utiliza en el presente documento, una biblioteca de "expresión en fagos" pretende referirse a una biblioteca en la que una multiplicidad de ligandos peptídicos se expresan en la superficie de un bacteriófago, tal como un fago filamentoso, preferentemente mediante fusión a una proteína de cubierta del fago (por ejemplo, la proteína pIII o la proteína pVIII del fago filamentosos). En los procedimientos de expresión en fagos, se sintetiza una multiplicidad de moléculas de ácido nucleico que codifican para ligandos peptídicos y se insertan en un vector fágico para proporcionar un vector recombinante. Vectores adecuados para la construcción de bibliotecas de expresión en fagos incluyen los vectores fUSE, tal como fUSE1, fUSE2, fUSE3 y fUSE (Smith y Scott (1993) *Methods Enzymol.* 217:228-257). Pueden sintetizarse moléculas de ácido nucleico de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Cormack y Struhl, (1993) *Science* 262:244-248), que incluyen la síntesis automatizada de oligonucleótidos. Después de la inserción de las moléculas de ácido nucleico en el vector fágico, el vector se introduce en una célula hospedadora adecuada y el fago recombinante se extruye de la célula después de un período de crecimiento. Esto da como resultado un sobrenadante que contiene el fago recombinante que a continuación puede utilizarse en ensayos de cribado con el péptido diana de interés (es decir, el péptido a utilizar en las composiciones de la invención).

[0044] Otro ejemplo de una biblioteca de ligandos peptídicos que puede utilizarse es una biblioteca de fagémidos que se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 5.925.559.

[0045] Otro ejemplo de una biblioteca de ligandos peptídicos codificada por una multiplicidad de moléculas de ácido nucleico es una biblioteca "interna", en la que los miembros ligandos peptídicos se expresan como fusiones con una proteína interna de un hospedador (es decir, una proteína que no es de superficie) insertando las moléculas de ácido nucleico que codifican los ligandos peptídicos en un gen que codifica la proteína interna. La proteína interna puede permanecer dentro de la célula o puede ser secretada por el hospedador, o recuperada a partir del mismo. Ejemplos de proteínas internas con las que pueden fusionarse los miembros de la biblioteca de ligandos peptídicos incluyen tiorredoxina, nucleasa estafilocócica, represor lac (LacI), GAL4 y anticuerpos. Un vector de biblioteca interna es

preferentemente un vector plasmídico. En un ejemplo de una biblioteca interna, denominada sistema de dos híbridos (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.283.173 de Field; Zervos *et al.* (1993) Cell 72:223-232; Madura *et al.* (1993) J. Biol. Chem. 268:12046-12054; Bartel *et al.* (1993) Biotechniques 14:920-924; e Iwabuchi *et al.* (1993) Oncogene 8:1693-1696), las moléculas de ácido nucleico que codifican una multiplicidad de ligandos peptídicos se insertan en un plásmido que codifica el dominio de unión a ADN de GAL4 (GAL4db) de manera que el plásmido codifica una biblioteca de proteínas de fusión de GAL4db-peptido. Las células de levadura (por ejemplo, células YPB2 de *Saccharomyces cerevisiae*) se transforman simultáneamente con el plásmido que codifica la biblioteca de las proteínas de fusión de GAL4db-ligando peptídico y un segundo plásmido que codifica una proteína de fusión compuesta por la diana fusionada al dominio de activación de GAL4 (GAL4ad). Cuando la GAL4ad-diana interactúa con un miembro de la biblioteca de GAL4db-peptido, los dos dominios de la proteína activadora de la transcripción de GAL4 se aproximan lo suficiente como para causar la transcripción de un gen indicador o un gen marcador fenotípico cuya expresión está regulada por uno o más operadores de GAL4.

[0046] En otro ejemplo de una biblioteca interna (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.270.181 y 5.292.646, ambas de Mc-Coy), las moléculas de ácido nucleico que codifican una multiplicidad de ligandos peptídicos se insertan en un plásmido que codifica la tiorredoxina de manera que el plásmido codifica una biblioteca de tiorredoxina-ligando peptídico y proteínas de fusión. El plásmido se introduce en una célula hospedadora bacteriana en la que las proteínas de fusión de tiorredoxina-peptido se expresan citoplásmicamente. Las proteínas de fusión pueden liberarse selectivamente de las células hospedadoras (por ejemplo, mediante choque osmótico o procedimientos de congelación-descongelación) y recuperarse para su uso en ensayos de cribado con el péptido diana de interés (es decir, el péptido a utilizar en las composiciones de la invención).

[0047] En todavía otro ejemplo de una biblioteca (descrita más adelante en Cull, M.G. *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865), las moléculas de ácido nucleico que codifican una multiplicidad de ligandos peptídicos se insertan en un gen que codifica LacI para crear un gen de fusión que codifica una proteína de fusión de LacI y los miembros de la biblioteca de ligandos peptídicos. El plásmido que codifica los miembros de la biblioteca de fusión de ligandos peptídicos está diseñado de manera que las proteínas de fusión se unan al plásmido (es decir, un plásmido que codifica las proteínas de fusión de LacI incluye secuencias del operador *lac* a las que se une LacI) de manera que las proteínas de fusión y los plásmidos que las codifican puedan unirse físicamente. Después de la expresión de las proteínas de fusión en las células hospedadoras, las células se lisan para liberar la proteína de fusión y el ADN asociado y la biblioteca se criba con una diana inmovilizada (el péptido a utilizar en las composiciones de la invención). Las proteínas de fusión que se unen a la diana se recuperan y el ADN asociado se reintroduce en células para la amplificación y la secuenciación, lo que permite la determinación de la secuencia del péptido codificado por el ADN.

[0048] Como alternativa a la formación de una biblioteca de ligandos peptídicos mediante la síntesis de una multiplicidad de moléculas de ácido nucleico que codifican los miembros de la biblioteca de ligandos peptídicos, la multiplicidad de ligandos peptídicos pueden sintetizarse directamente mediante procedimientos químicos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede sintetizarse una multiplicidad de ligandos peptídicos por "síntesis mediante partición" de ligandos peptídicos sobre soportes sólidos (véase, por ejemplo, Lam, K.S. *et al.* (1993) Bioorg. Med Chem. Lett. 3:419-424). Otras síntesis químicas ejemplares de bibliotecas de ligandos peptídicos incluyen el procedimiento de varillas (véase, por ejemplo, Geysen, H.M. *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002); el procedimiento de bolsa de té (véase, por ejemplo, Houghten, R.A. *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5131-5135); el acoplamiento de mezclas de aminoácidos (véase, por ejemplo, Tjoeng, F.S. *et al.* (1990) Int. J. Pept. Protein Res. 35:141-146; la patente de EE.UU. 5.010.175 de Rutter *et al.*), y la síntesis de conjuntos espaciales de compuestos (véase, por ejemplo, Fodor, S.P.A. *et al.* (1991) Science 251:767). Las bibliotecas de ligandos peptídicos formadas por síntesis directa de los miembros de la biblioteca de ligandos peptídicos están unidas preferentemente a un soporte sólido (por ejemplo, una perla o varilla, en la que cada perla o varilla está unida a un solo resto peptídico) para facilitar la separación de los ligandos peptídicos que se unen a una diana (el péptido a utilizar en las composiciones de la invención) de los ligandos peptídicos candidatos que no se unen a la diana.

[0049] Una vez que se ha formado la biblioteca de ligandos, el péptido diana de interés (es decir, el péptido a utilizar en las composiciones de la invención) se criba con la biblioteca de ligandos para identificar uno o más miembros de la biblioteca que se unen al péptido. Los ligandos que se unen al péptido (es decir, el péptido a utilizar en las composiciones de la invención) puede seleccionarse de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como bioselección de un péptido diana inmovilizado con una biblioteca de expresión en fagos. En una forma de realización, un péptido diana biotinilado se inmoviliza sobre una superficie recubierta con estreptavidina, ya sea antes o después de poner en contacto el péptido diana con una biblioteca de ligandos y los ligandos no unidos se eliminan por lavado. Las bibliotecas de ligandos unidas a un soporte sólido pueden cribarse, por ejemplo, poniendo en contacto los ligandos inmovilizados sobre el soporte sólido con un péptido diana marcado y detectando el péptido diana marcado unido a los miembros de la biblioteca o, de manera alternativa, liberando los ligandos del soporte sólido y sometiendo a ensayo la solución resultante (véase, por ejemplo, Ohlmeyer, M.H.J. *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10922:10926).

[0050] El miembro o los miembros de la biblioteca seleccionados tienen una constante de unión para la unión al péptido diana de 10 mM o menos, preferentemente aproximadamente 1 mM o menos, aproximadamente 100 nM o

menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos. El miembro o los miembros de la biblioteca seleccionados comprenden preferentemente 30 o menos, 20 o menos, 15 o menos, o diez o menos restos de aminoácidos.

5 **[0051]** Los ligandos (o subcombinaciones de los mismos) también puede unirse indirectamente a una macromolécula portadora, a través de interacciones covalentes, a través de interacciones iónicas, a través de interacciones hidrófobas, o una combinación de las mismas. Por consiguiente, el ligando debe incluir también una región que le permita interactuar con otro ligando o con un agente de entrecruzamiento o una macromolécula portadora.

10 **[0052]** Por lo tanto, en caso necesario, después de la selección de uno o más miembros de la biblioteca de péptidos ligando que se unen al péptido diana (es decir, el péptido a utilizar en las composiciones de la invención) el ligando puede modificarse de manera que sea capaz de unirse a otros ligandos o a macromoléculas portadoras o agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, el ligando puede fusionarse a una secuencia de aminoácidos que lleva una carga electrónica neta, por ejemplo, un péptido policatiónico, tal como poli-L-lisina, o un péptido polianiónico, tal como poli-L-glutamato.

15 **[0053]** Además, los ligandos de la presente invención pueden modificarse para contener uno o más grupos funcionales ácidos o básicos, de manera que sean capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con ácidos o bases farmacéuticamente aceptables, respectivamente, presentes en, por ejemplo, otros ligandos, macromoléculas portadoras o agentes de entrecruzamiento. Bases adecuadas incluyen hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión de metal farmacéuticamente aceptable, con amoníaco, o con una amina primaria, secundaria o terciaria orgánica farmacéuticamente aceptable. Sales alcalinas o alcalinotérreas representativas incluyen las sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio y similares. Aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de bases incluyen etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, y piperazina.

20 **[0054]** Además, los ligandos de la presente invención pueden modificarse para contener biotina, de manera que sean capaces de entrecruzarse con un agente de entrecruzamiento, tal como avidina o estreptavidina; o con otro ligando que contenga avidina o estreptavidina. También es posible modificar los ligandos de la presente invención para que contengan avidina o estreptavidina, de manera que sean capaces de entrecruzarse con un agente de entrecruzamiento tal como biotina, o con otro ligando que contenga biotina.

25 **[0055]** Los ligandos peptídicos de la presente invención también pueden unirse utilizando entrecruzadores heterobifuncionales, que unen las proteínas de una forma progresiva. En la técnica se conoce una amplia variedad de entrecruzadores heterobifuncionales y se describen en el presente documento.

III. Procedimientos para preparar las composiciones de la invención

40 **[0056]** Otro aspecto de la invención se refiere a procedimientos para preparar las composiciones de la invención. En una forma de realización, el procedimiento incluye proporcionar un péptido y una pluralidad de ligandos para el péptido; y combinar la molécula portadora con el péptido y la pluralidad de ligandos en condiciones tales que se forme un complejo insoluble en agua del péptido, la pluralidad de ligandos, y la molécula portadora.

45 **[0057]** Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "complejo insoluble en agua" pretende referirse a un complejo física y químicamente estable que se forma tras la combinación apropiada de un péptido y una pluralidad de ligandos (o un péptido, una pluralidad de ligandos, y una macromolécula portadora o un agente de entrecruzamiento) de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento. Este complejo, toma la forma por lo general de un precipitado que se produce tras combinar preparaciones acuosas del péptido y la pluralidad de ligandos (o el péptido, la pluralidad de ligandos, y la macromolécula portadora o el agente de entrecruzamiento). Aunque no pretende estar limitada por el mecanismo, se cree que la formación de complejos insolubles en agua preferentes de la invención está mediada por (por ejemplo, está mediada, por lo menos en parte por) interacciones iónicas en situaciones en las que el péptido es catiónico y cada uno de la pluralidad de ligandos (o molécula portadora o agente de entrecruzamiento) es aniónico o viceversa. Adicionalmente, la formación de un complejo insoluble en agua de la invención puede estar mediada (por ejemplo, estar mediada, por lo menos en parte por) interacciones hidrófobas. Aún más, la formación de un complejo insoluble en agua de la invención puede estar mediada (por ejemplo, estar mediada, por lo menos en parte por) interacciones covalentes. La descripción del complejo como "insoluble en agua" pretende indicar que el complejo no se disuelve prácticamente o fácilmente en agua, como se indica mediante su precipitación en solución acuosa. Sin embargo, debe entenderse que un complejo "insoluble en agua" de la invención pueden presentar una solubilidad limitada en agua, ya sea *in vitro* o en el entorno acuoso fisiológico *in vivo*.

60 **[0058]** Por lo general, una solución del péptido y una solución de la pluralidad de ligandos se combinan hasta que un complejo insoluble en agua del péptido y la pluralidad de ligandos precipita a partir de la solución. Puede ajustarse el pH o la fuerza iónica de la solución para optimizar la precipitación del complejo. El pH se ajustará preferentemente de manera que sea cercano al pH fisiológico. En determinadas formas de realización, las soluciones del péptido y la

pluralidad de ligandos son soluciones acuosas. De manera alternativa, si el péptido o la pluralidad de ligandos (o ambos) no son sustancialmente solubles en agua antes de la combinación de los dos, entonces el péptido y/o la pluralidad de ligandos pueden disolverse en un disolvente miscible en agua, tal como un alcohol (por ejemplo, etanol) antes de combinar los dos componentes del complejo. En otra forma de realización del procedimiento de preparación del complejo insoluble en agua, la solución del péptido y la solución de la pluralidad de ligandos se combinan y se calientan hasta que un complejo insoluble en agua del péptido y la pluralidad de ligandos precipita a partir de la solución. Las cantidades de péptido y la pluralidad de ligandos necesarios para lograr el complejo insoluble en agua pueden variar en función del péptido y del ligando concreto utilizado, el disolvente o disolventes concretos utilizados y/o el procedimiento utilizado para lograr el complejo. En determinadas formas de realización, el ligando y el péptido se combinan en una relación de, por ejemplo, 0,5:1 a 0,1:1. En otras formas de realización, el ligando y el péptido utilizado para formar el complejo se combinan en una relación en peso de ligando:péptido de 0,9:1, 0,8:1, 0,7:1, 0,6:1, 0,5:1, 0,4:1, 0,3:1, 0,25:1, 0,2:1, 0,15:1, ó 0,1:1. Los intervalos intermedios de los valores enumerados anteriormente, por ejemplo, 0,8:1 a 0,4:1, 0,6:1 a 0,2:1, ó 0,5:1 a 0,1:1 también pretenden ser parte de esta invención. Por ejemplo, pretenden estar incluidos los intervalos de los valores que utilizan una combinación de cualquiera de los valores enumerados anteriormente como límites superior y/o inferior.

[0059] En otra forma de realización, el contenido de péptido del complejo es de por lo menos 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, ó 98% en peso. Los intervalos intermedios de los valores anteriormente enumerados, por ejemplo, por lo menos de aproximadamente 50% a aproximadamente 80%, por lo menos de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, o por lo menos de aproximadamente 57% a aproximadamente 82%, también pretenden ser parte de esta invención. Por ejemplo, pretenden estar incluidos los intervalos de los valores que utilizan una combinación de cualquiera de los valores enumerados anteriormente como límites superior y/o inferior.

[0060] Una vez que el complejo péptido/ligando precipita a partir de la solución, el precipitado puede recogerse de la solución por medios conocidos en la técnica, tales como filtración (por ejemplo, a través de una membrana de nailon de 0,45 micras), centrifugación y similares. A continuación, el gel o pasta recuperada puede secarse (por ejemplo, al vacío o en un horno a 70°C) y el sólido puede ser molido o pulverizado hasta un polvo por medios conocidos en la técnica (por ejemplo, trituración en molino de bolas o martillo, o en un molino de energía fluida, o molienda con mortero y mano de mortero). De manera alternativa, el gel o pasta puede congelarse y liofilizarse a sequedad. Antes o durante el aislamiento del gel o la pasta puede introducirse una etapa de concentración o dilución o ajuste de la polaridad, el pH, o la fuerza iónica. La forma en polvo, gel o pasta del complejo puede dispersarse en una solución portadora para formar una suspensión líquida o una dispersión semisólida adecuada para inyección. Por consiguiente, en diversas formas de realización, una formulación farmacéutica de la invención es un sólido liofilizado, una suspensión líquida o una dispersión semisólida.

[0061] La forma en polvo, gel o pasta del complejo puede comprimirse en comprimidos o esferas, o extraerse o comprimirse en una barra o un disco. La forma en polvo, gel o pasta del complejo puede estar en una estructura amorfa cristalina o pseudocristalina, o en un cilindro de hidratación de tipo clatrato.

[0062] En otra forma de realización, la composición de la invención es una formulación estéril. Por ejemplo, después de la formación del complejo insoluble en agua, el complejo puede esterilizarse, de manera óptima por irradiación (por ejemplo, irradiación gamma) o esterilización con haz de electrones. Por consiguiente, el procedimiento de la invención para preparar una composición como se ha descrito anteriormente puede comprender adicionalmente la esterilización del complejo insoluble en agua por irradiación gamma o irradiación con haz de electrones. De manera alternativa, para preparar una composición estéril, el complejo insoluble en agua puede aislarse utilizando técnicas estériles convencionales (por ejemplo, utilizando materiales de partida estériles y llevando a cabo el proceso de producción de manera aséptica). Por consiguiente, en otra forma de realización del procedimiento para preparar una composición como se ha descrito anteriormente, el complejo insoluble en agua se forma utilizando procedimientos asépticos.

[0063] Las formulaciones farmacéuticas, que incluyen polvos, suspensiones líquidas, dispersiones semisólidas, sólidos liofilizados y formas esterilizadas de los mismo (por ejemplo, mediante irradiación gamma), preparados de acuerdo con los procedimientos de la invención, quedan también abarcados por la invención.

IV. Procedimientos de uso de las composiciones de la invención

[0064] Las composiciones de la invención puede utilizarse en un procedimiento para tratar a un sujeto con una afección tratable con un péptido administrando al sujeto una composición que incluye el péptido, la pluralidad de ligandos para el péptido, y una molécula portadora. Preferentemente, la composición se esteriliza mediante, por ejemplo, irradiación gamma o irradiación con haz de electrones, antes de la administración *in vivo*.

[0065] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" pretende incluir animales de sangre caliente, preferentemente mamíferos, lo más preferentemente seres humanos.

[0066] Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "administrar a un sujeto" pretende referirse a la

5 dispensación, administración o la aplicación de las composiciones de la invención a un sujeto por cualquier vía adecuada para la administración de la composición en la ubicación deseada en el sujeto, que incluye la administración por vía parenteral u oral, inyección intramuscular, inyección subcutánea/intradérmica, inyección intravenosa, administración bucal, administración transdérmica y administración por vía rectal, colónica, vaginal, intranasal o del tracto respiratorio.

10 **[0067]** Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "una afección tratable con un péptido" pretende incluir enfermedades, trastornos y otras afecciones en las que la administración de un péptido tiene un efecto deseado, por ejemplo, un efecto terapéutico beneficioso. La enfermedad, el trastorno u otra afección pueden ser una enfermedad, un trastorno, u otra afección local o sistémica. Ejemplos de afecciones tratables con un péptido incluyen trastornos del sistema nervioso central (SNC) tales como los trastornos cognitivos y neurodegenerativos, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, la enfermedad de Alzheimer, las demencias relacionadas con la enfermedad de Alzheimer (tales como la enfermedad de Pick), el Parkinson y otras enfermedades con cuerpos difusos de Lewy, la demencia senil, la miastenia gravis, la enfermedad de Huntington, el síndrome de Gilles de la Tourette, la esclerosis múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica, la parálisis supranuclear progresiva, la epilepsia y la enfermedad de Jakob-Creutzfeldt; los trastornos de las funciones autónomas tales como la hipertensión y los trastornos del sueño, y los trastornos neuropsiquiátricos, tales como la depresión, la esquizofrenia, el trastorno esquizoafectivo, la psicosis de Korsakoff, la manía, los trastornos de ansiedad o los trastornos fóbicos; los trastornos del aprendizaje o de la memoria, por ejemplo, la amnesia o la pérdida de memoria relacionada con la edad, el trastorno por déficit de atención, el trastorno distímico, el trastorno depresivo mayor, la manía, el trastorno obsesivo-compulsivo, los trastornos por consumo de sustancias psicoactivas, la ansiedad, las fobias, el trastorno de pánico, así como el trastorno afectivo bipolar, por ejemplo, el trastorno afectivo bipolar (estado de ánimo) severo (BP-1), y los trastornos neurológicos afectivos bipolares, por ejemplo, la migraña y la obesidad. Trastornos relacionados con el SNC adicionales incluyen, por ejemplo, los enumerados en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales de la Asociación Americana de Psiquiatría (DSM), cuya versión más reciente se incorpora en el presente documento en su totalidad por referencia.

30 **[0068]** Ejemplos adicionales de afecciones tratables con un péptido incluyen trastornos del sistema cardiovascular, tales como la arteriosclerosis, la lesión por isquemia-reperfusión, la reestenosis, la inflamación arterial, el remodelado de la pared vascular, el remodelado ventricular, la estimulación ventricular rápida, el microembolismo coronario, la taquicardia, la bradicardia, la sobrecarga de presión, la torsión aórtica, la ligadura de las arterias coronarias, la enfermedad cardíaca vascular, la fibrilación auricular, el síndrome de Jervell, el síndrome de Lange-Nielsen, el síndrome de QT largo, la insuficiencia cardíaca congestiva, la disfunción del nodo sinusal, la angina, la insuficiencia cardíaca, la hipertensión, la fibrilación auricular, el aleteo auricular, la miocardiopatía dilatada, la cardiomiopatía idiopática, el infarto de miocardio, la enfermedad de la arteria coronaria, el espasmo de la arteria coronaria y las arritmias.

40 **[0069]** Ejemplos de afecciones tratables con un péptido también incluyen los trastornos de la proliferación, el crecimiento, la diferenciación, o la migración celular tales como el cáncer, por ejemplo, el cáncer de próstata, el cáncer de ovario, la endometriosis, los fibromas uterinos, el cáncer de mama, el síndrome de ovario poliquístico, el carcinoma, el sarcoma, o la leucemia; la hipertrofia prostática benigna; la angiogénesis tumoral y las metástasis; la displasia esquelética, los trastornos hematopoyéticos y/o mieloproliferativos.

45 **[0070]** Ejemplos adicionales de afecciones tratables con un péptido incluyen los trastornos hormonales, tales como la diabetes mellitus tipo I y tipo II, los trastornos de la pituitaria (por ejemplo, los trastornos del crecimiento), los trastornos de la tiroides (por ejemplo, el hipotiroidismo o el hipertiroidismo), y los trastornos de la reproducción o la fertilidad (por ejemplo, los trastornos que afectan a los órganos del sistema reproductor, por ejemplo, la glándula prostática, el útero o la vagina; los trastornos que implican un desequilibrio en los niveles de una hormona reproductora en un sujeto; los trastornos que afectan a la capacidad de un sujeto para reproducirse; y los trastornos que afectan al desarrollo de las características sexuales secundarias, (por ejemplo, la hiperplasia suprarrenal).

55 **[0071]** Ejemplos de afecciones tratables con un péptido incluyen adicionalmente los trastornos inflamatorios o del sistema inmunológico, tales como la infección viral, la enfermedad inflamatoria intestinal, la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn, el síndrome de deficiencia de adhesión leucocitaria tipo II, la peritonitis, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la inflamación pulmonar, el asma, la apendicitis aguda, el shock séptico, la nefritis, la amiloidosis, la artritis reumatoide, la bronquitis crónica, la sarcoidosis, la esclerodermia, el lupus, la polimiositis, el síndrome de Reiter, la psoriasis, la enfermedad inflamatoria pélvica, la enfermedad inflamatoria de la mama, la enfermedad inflamatoria orbitaria, los trastornos de inmunodeficiencia (por ejemplo, el VIH, la inmunodeficiencia variable común, la hipogammaglobulinemia infantil congénita ligada al cromosoma X, la hipogammaglobulinemia transitoria, la deficiencia selectiva de IgA, la candidiasis mucocutánea crónica, la inmunodeficiencia combinada severa), los trastornos autoinmunes.

65 **[0072]** Las afecciones tratables con un péptido también incluyen los trastornos hematopoyéticos o trombóticos, por ejemplo, la coagulación intravascular diseminada, la enfermedad vascular tromboembólica, la anemia, el linfoma, la leucemia, la neutrofilia, la neutropenia, los trastornos mieloproliferativos, la trombocitosis, la trombocitopenia, la enfermedad de Von Willebrand, y la hemofilia.

5 [0073] Las afecciones tratables con un péptido incluyen adicionalmente los trastornos gastrointestinales y digestivos, tales como los trastornos del esófago, tal como la atresia y las fístulas, la estenosis, la acalasia, los anillos y membranas esofágicas, la hernia de hiato, las laceraciones, la esofagitis, los divertículos, la esclerosis sistémica (esclerodermia), las varices, los tumores de esófago tales como los adenocarcinomas y los carcinomas de células
 10 escamosas, los trastornos estomacales tales como las hernias diafragmáticas, la estenosis pilórica, la dispepsia, la gastritis, la erosión y ulceración gástrica aguda, las úlceras pépticas, los tumores de estómago tales como los carcinomas y los sarcomas, los trastornos del intestino delgado tales como la estenosis y la atresia congénita, los divertículos, el divertículo de Meckel, los restos pancreáticos, la enfermedad isquémica del intestino, la enterocolitis infecciosa, la enfermedad de Crohn, los tumores del intestino delgado tales como los carcinomas y los sarcomas, los
 15 trastornos del colon tales como la malabsorción, las lesiones obstructivas tales como las hernias, el megacolon, la enfermedad diverticular, la melanosis coli, la lesión isquémica, las hemorroides, la angiodisplasia de colon derecho, las inflamaciones del colon tales como la colitis ulcerativa y los tumores de colon tales como los pólipos y los sarcomas; así como los trastornos metabólicos (por ejemplo, la enfermedad de depósito lisosomal, la glucogenolisis de tipo II, la enfermedad de Fabry, las deficiencias enzimáticas y los errores innatos del metabolismo); los trastornos hepáticos y los trastornos renales (por ejemplo, la insuficiencia renal y la glomerulonefritis).

[0074] Ejemplos adicionales de afecciones tratables con un péptido incluyen las afecciones asociadas al parto, tales como el parto prematuro o el parto tardío.

20 [0075] Las composiciones de la invención pueden administrarse al sujeto por cualquier vía adecuada para lograr el resultado o los resultados terapéuticos deseados, aunque las vías de administración preferentes son las vías parenterales, en concreto la inyección intramuscular (i.m.) y la inyección subcutánea/intradérmica (s.c./i.d.). De manera alternativa, las composiciones de la invención pueden administrarse al sujeto por vía oral. Otras vías parenterales adecuadas incluyen la inyección intravenosa, la administración bucal, la administración transdérmica y
 25 la administración por vía rectal, vaginal, oftálmica, intranasal o del tracto respiratorio (por ejemplo, por inhalación, inspiración, o nebulización). Para la administración por inhalación, las composiciones de la invención pueden administrarse en forma de pulverización de aerosol desde un dispensador o recipiente presurizado que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, MFA, CFC, o un nebulizador.

30 [0076] Hay que reseñar que cuando una composición que proporciona la administración sostenida durante semanas o meses por vía i.m. o s.c./i.d. se administra por una vía alternativa, puede no ser una administración sostenida del péptido para una duración de tiempo equivalente debido a la eliminación del péptido por otros mecanismos fisiológicos (es decir, la forma de dosificación puede eliminarse del sitio de administración de manera que no se observen efectos terapéuticos prolongados durante períodos de tiempo tan largos como los observados con la
 35 inyección i.m. o s.c./i.d.).

[0077] Pueden administrarse uno o más péptidos a un sujeto en la misma cantidad o en una cantidad diferente para lograr un resultado terapéutico o diagnóstico.

40 [0078] Cuando se administra a un sujeto con fines terapéuticos, las composiciones de la invención contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad y el peso del individuo, y la capacidad del péptido para producir una respuesta deseada en el sujeto. Pueden
 45 ajustarse los regímenes de dosificación para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del péptido es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Un intervalo no limitativo para una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido es de 0,001 a 15 mg/kg. Hay que reseñar que los valores de dosificación pueden variar con la gravedad de la afección a aliviar. Se sobrentiende que para cualquier sujeto concreto, deben ajustarse los regímenes de dosificación específicos a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la
 50 persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación presentados en el presente documento son solo ejemplares y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

55 [0079] En otra forma de realización, las composiciones de la invención pueden utilizarse para fines de diagnóstico. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden utilizarse para administrar un complejo péptido-ligando marcado en un lado dentro de un sujeto para la detección de, por ejemplo, un tumor, un trombo, o una placa amiloide asociada con la enfermedad de Alzheimer.

60 **V. Formulaciones envasadas que contienen las composiciones de la invención**

[0080] Además de las composiciones de péptidos que forman complejos con una pluralidad de ligandos, y una macromolécula portadora, la invención puede utilizarse para proporcionar formulaciones envasadas que contienen
 65 tales complejos y jeringas que contienen tales complejos. Por ejemplo, la invención puede utilizarse en formulaciones envasadas para tratar a un sujeto con una afección tratable con un péptido, por ejemplo, un péptido farmacéuticamente activo, que comprende un complejo insoluble en agua de un péptido y una pluralidad de ligandos

y una macromolécula portadora envasado con instrucciones para el uso del complejo insoluble en agua para tratar a un sujeto con una afección tratable con un péptido. En otra forma de realización, la invención puede utilizarse en una jeringa que tiene un lumen, en el que un complejo insoluble en agua de un péptido, una pluralidad de ligandos y una macromolécula portadora está incluido en el lumen.

5

[0081] A continuación se describen determinadas formas de realización preferentes de la invención.

Péptido-ligando-macromolécula portadora

10 **[0082]** El ligando es un péptido que comprende una secuencia de unión y una secuencia cargada. La secuencia de unión y la secuencia cargada pueden conectarse directamente, por ejemplo, a través de un enlace peptídico, o indirectamente, por ejemplo, a través de una secuencia peptídica intermedia o un resto de unión no peptídico. En una forma de realización, la secuencia de unión y la secuencia cargada se solapan, es decir, la secuencia de unión y la secuencia cargada comparten uno o más restos de aminoácidos. La secuencia cargada puede ser cualquier
15 secuencia de aminoácidos que lleve una carga neta positiva o negativa en condiciones fisiológicas. Preferentemente, la secuencia cargada tiene una carga neta polianiónica o policatiónica a pH fisiológico. La secuencia de unión comprende dos o más restos de aminoácidos, preferentemente tres o más restos, más preferentemente cuatro o más restos y, lo más preferentemente cinco o más restos. En una forma de realización, la secuencia de unión comprende de dos a aproximadamente veinte restos de aminoácidos, más preferentemente de
20 aproximadamente cinco a aproximadamente doce restos y, lo más preferentemente, de aproximadamente cinco a aproximadamente diez restos. La secuencia cargada comprende preferentemente de aproximadamente dos a aproximadamente veinte restos de aminoácidos, más preferentemente de aproximadamente cinco a aproximadamente veinte restos y lo más preferentemente de aproximadamente cinco a aproximadamente doce restos.

25

[0083] En una forma de realización, la secuencia cargada es una secuencia que facilita el transporte a través de membranas celulares. Por ejemplo, se conoce una variedad de secuencias catiónicas que sirven como agentes de transporte intracelular. Ejemplos adecuados de tales secuencias incluyen el dominio de transducción de proteínas de 11 restos de la proteína TAT del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y secuencias similares que comprenden restos de arginina múltiples, tal como se describen en los documentos WO 99/29721, WO 99/55899 y WO 99/10376. Otras secuencias adecuadas cargadas incluyen secuencias de poli(arginina) y poli(d-arginina). Péptidos adecuados adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en Derossi *et al.*, (1994) J. Biol. Chem. 269, 10444-10450; Lindgren *et al.*, (2000) Trends Pharmacol. Sci. 21, 99-103; Ho *et al.*, Cancer Research 61, 474-477 (2001); la patente de EE.UU. N° 5.888.762; la patente de EE.UU. N° 6.015.787; la patente de EE.UU. N° 5.846.743; la patente de EE.UU. N° 5.747.641; la patente de EE.UU. N° 5.804.604.

35

[0084] En esta forma de realización, el ligando que comprende una secuencia de unión y una secuencia cargada está asociado, a través de la secuencia de unión, con una proteína o péptido de interés, es decir, una proteína o péptido terapéutico, y, a través de la secuencia cargada, a una macromolécula portadora cargada, tal como un polímero o polielectrolito cargado. La macromolécula portadora tendrá, en condiciones fisiológicas, una carga iónica de signo opuesto a la de la secuencia cargada e interactuará electrostáticamente con la secuencia cargada. Por lo tanto, las moléculas de ligando y la macromolécula portadora, sirven para entrecruzar múltiples moléculas de proteínas y formar un complejo que tiene, a lo sumo, una solubilidad acuosa limitada en condiciones fisiológicas.

40

45 **[0085]** En un ejemplo comparativo, el ligando puede ser un compuesto no peptídico que incluye un dominio de unión y un dominio cargado. En esta forma de realización, el ligando puede ser cualquier molécula que se una a la proteína con una constante de unión suficiente. El dominio cargado puede incluir uno o más, preferentemente dos o más, grupos funcionales que llevan una carga eléctrica en condiciones fisiológicas, por ejemplo, grupos aniónicos tales como carboxilato, carbonato, fosfonato, sulfonato, fosfato, sulfato y grupos sulfamato, y grupos catiónicos, tales como amonio primario, secundario, terciario y cuaternario, fosfonio, sulfonio, guanidinio y grupos iminio. Preferentemente, el dominio cargado tiene una carga neta policatiónica o polianiónica en condiciones fisiológicas. En una forma de realización, el dominio de unión es no peptídico y el dominio cargado es una secuencia peptídica, tal como una de las secuencias cargadas descritos anteriormente.

50

55 **Péptido-ligando polivalente**

[0086] En otra forma de realización, el ligando es un compuesto peptídico multivalente. En esta forma de realización, cada molécula de ligando comprende dos o más secuencias de unión que están directa o indirectamente conectadas covalentemente. Por ejemplo, las secuencias de unión pueden conectarse a través de su extremo terminal N o C a un grupo de unión covalente. El grupo unión covalente puede ser peptídico o no peptídico. En una forma de realización, el grupo de unión comprende una secuencia peptídica lineal con una secuencia de unión fijada a su extremo C-terminal y otro dominio de unión fijado en su extremo N-terminal. En otra forma de realización, el grupo de unión es una secuencia peptídica ramificada, tal como una secuencia que incluye uno o más restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales a las que puede conectarse una secuencia adicional, tal como una lisina (-NH₂), un resto de aspartato (-C(O)OH) o glutamato (-C(O)OH) en el que el grupo funcional de la cadena lateral indicada sirve como punto de partida para una secuencia peptídica de ramificación. Tales grupos peptídicos

65

ramificados pueden unir por lo menos dos y, preferentemente, tres o más secuencias de unión.

[0087] El grupo de unión puede ser también no peptídico, por ejemplo, grupos no peptídicos derivados de una molécula no peptídica que tiene dos o más grupos funcionales que pueden reaccionar con el grupo amino N-terminal o el grupo carboxilato C-terminal de dos o más secuencias de unión. Grupos de unión disfuncionales adecuados incluyen $\text{NH}-(\text{CH}_2)_n\text{-NH-}$, $\text{y-C(O)-(CH}_2)_n\text{C(O)-}$, donde n es dos o superior, preferentemente de dos a aproximadamente veinticuatro. Otros grupos de unión adecuados pueden derivarse, por ejemplo, de agentes de entrecruzamiento conocidos, tales como poliaminas y ácidos policarboxílicos utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Tales agentes de entrecruzamiento incluyen, pero no se limitan a, succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), aminobenzoato de n-succinimidil (4-yodoacetil) (SIAB), butirato de succinimidil 4-(p-maleimidofenil) (SMPB), hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC); 4-succinimidil-oxicarbonil-a-metil-a-(2-piridilditio)-tolueno (SMPT), N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil 6-[3-(2-piridilditio) propionato] hexanoato (LC-SPDP).

Fármaco-macromolécula portadora

[0088] La presente invención proporciona adicionalmente un complejo iónico sólido que comprende un fármaco terapéuticamente activo que tiene una carga iónica en condiciones fisiológicas y una macromolécula portadora iónica, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, el fármaco puede ser cualquier compuesto que tenga utilidad terapéutica o diagnóstica que incluye uno o más grupos funcionales que llevan una carga iónica en condiciones fisiológicas, tales como uno de los grupos descritos anteriormente. Preferentemente, el fármaco es policatiónico o polianiónico en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, en una forma de realización, el fármaco incluye uno o más átomos de nitrógeno básicos, y la macromolécula portadora es un polímero aniónico, tal como carboximetilcelulosa. El fármaco es un compuesto peptídico tal como se define en la reivindicación 1 de las reivindicaciones adjuntas.

[0089] Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

Ejemplos

EJEMPLO 1:

[0090] Se aísla un ligando peptídico para la hormona del crecimiento humano (hGH) mediante cribado por afinidad de una biblioteca de péptidos, como se conoce en la técnica. La secuencia del ligando se determina utilizando procedimientos conocidos y el ligando se sintetiza con una secuencia catiónica adicional de diez restos de aminoácidos en el extremo terminal N o C del ligando, para formar un ligando modificado. La hormona del crecimiento humano y el ligando modificado se combinan en solución acuosa en presencia de carboximetilcelulosa, precipitando de esa manera un complejo sólido que comprende hGH, el ligando modificado y carboximetilcelulosa.

EJEMPLO 2:

[0091] El ligando peptídico para hGH descrito en el Ejemplo 1, se fusiona a una secuencia de unión Gly₁₀ en su extremo amino terminal utilizando procedimientos de síntesis de péptidos convencionales. A continuación, se une el péptido de fusión Gly₁₀-ligando resultante a los grupos carboxilo de la carboximetilcelulosa a través de enlaces amida, utilizando procedimientos sintéticos conocidos en la técnica. A continuación, la carboximetilcelulosa derivatizada con el péptido resultante se combina en una solución acuosa con hGH, y se aísla el precipitado resultante.

EJEMPLO 3:

[0092] El péptido de fusión Gly₁₀-ligando descrito en el Ejemplo 2 se acopla en su extremo N-terminal a 1,3,5-tris(2-carboxietil)benceno a través de la formación de un enlace amida, como se conoce en la técnica. A continuación, el compuesto tri(peptídico) resultante se combina en una solución con hGH, lo que dan como resultado la precipitación de un sólido, que se recoge por filtración.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

- 5 (a) un péptido farmacéuticamente activo seleccionado del grupo que consiste en insulina, eritropoyetina, hormona del crecimiento, bradiquinina, hormona paratiroidea, hormona adenocorticotrópica, calcitonina, vasopresina, angiotensina, desmopresina, hormona liberadora de la hormona luteinizante, Leuprolida que tiene la estructura pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro(etilamida)-Gly, Cetorelix, que tiene la estructura Ac-D-Nal-4-Cl-DPhe-D-Pal-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala, Ac-D-Nal-4-Cl-D-Phe-D-Pal-Ser-N-Me-Tyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala, somatostatina, glucagón, somatomedina, oxitocina, gastrina, secretina, hormona estimuladora de melanocitos, beta-endorfina, encefalina, neotrotenina, hormona liberadora tiroidea, factor estimulador de macrófagos, CCR-5, factor de necrosis tumoral (TNF), factor liberador de la hormona del crecimiento (GRF), RGD, e interleucina, y
- 10 (b) una pluralidad de ligandos para dicho péptido, comprendiendo cada uno de dichos ligandos una secuencia de unión y una secuencia cargada;
- 15 en la que dicha pluralidad de ligandos son moléculas peptídicas que tienen la capacidad de unirse a dicho péptido farmacéuticamente activo con una constante de unión de 10 mM o menos y son ligandos naturales para el péptido o ligandos artificiales para el péptido, y
- 20 (c) una macromolécula portadora iónica que tiene una carga opuesta a la carga de dichos ligandos,

en la que dicha macromolécula portadora está seleccionada del grupo que consiste en un polisacárido aniónico, un polialcohol aniónico, un aminoácido polianiónico, una poli(alilamina), una poli(vinilamina), una poli(etilenimina), una poli(alilamina) N alquilada, una poli(vinilamina) N alquilada, una poli(etilcneimina) N-alquilada, y un polímero de aminoácidos básicos; poli(acrilato); poli(metacrilato); poli-L-lisina; poli-L-arginina, dietilaminoetil dextrano, dietilaminoetil celulosa y poli(d-glucosamina);

25 en la que dicha pluralidad de ligandos se unen a través de dicha macromolécula portadora, en la que dicho péptido farmacéuticamente activo, dicha pluralidad de ligandos, y dicha macromolécula portadora, forman conjuntamente un complejo insoluble en agua cuya formación está mediada, por lo menos en parte, por interacciones iónicas de la pluralidad de ligandos y la macromolécula portadora, y en la que la composición

30 proporciona una administración sostenida del péptido farmacéuticamente activo a un sujeto durante por lo menos una semana después de administrar la composición farmacéutica al sujeto.

2. La composición según la reivindicación 1, en la que la composición proporciona una administración sostenida del péptido farmacéuticamente activo a un sujeto durante por lo menos dos a cuatro semanas después de administrar la composición al sujeto.

35

3. La composición según la reivindicación 1, en la que la macromolécula portadora iónica es aniónica y está seleccionada del grupo que consiste en carboximetilcelulosa, algina, alginato, almidón glicolato sódico, carragenina, poli(acrilato), y poli(metacrilato).

40

4. Un procedimiento para preparar una composición según la reivindicación 1, que comprende:

45 proporcionar un péptido farmacéuticamente activo tal como se define en la reivindicación 1, una pluralidad de ligandos para dicho péptido, siendo cada uno de dichos ligandos tal como se define en la reivindicación 1, y una macromolécula portadora iónica tal como se define en la reivindicación 1 que tiene una carga opuesta a la carga de dichos ligandos; y combinar el péptido, la pluralidad de ligandos para el péptido, y la macromolécula portadora en condiciones tales que se forme un complejo insoluble en agua del péptido, la pluralidad de ligandos, y la macromolécula portadora, en la que la formación del complejo insoluble en agua está mediada, por lo menos en parte, por interacciones iónicas de la pluralidad de ligandos y la macromolécula portadora.

50

5. El procedimiento según la reivindicación 4, que comprende adicionalmente la esterilización del complejo insoluble en agua mediante irradiación gamma o irradiación con haz de electrones.

55 6. El procedimiento según las reivindicaciones 4 ó 5, en el que el complejo insoluble en agua se forma utilizando procedimientos asépticos.

7. El uso de una composición según la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para tratar a un sujeto con una afección tratable con dicho péptido farmacéuticamente activo.

60

8. La composición según la reivindicación 1, en la que cada uno de dichos ligandos comprende una primera región adecuada para unirse a dicho péptido y una segunda región que está cargada negativamente si la pluralidad de ligandos están cargados negativamente o está cargada positivamente si la pluralidad de ligandos están cargados positivamente, y en la que la macromolécula portadora iónica tiene una carga opuesta a la carga de dicha segunda región en cada uno de dichos ligandos.

65

9. La composición según la reivindicación 1, en la que cada uno de dichos ligandos comprende una pluralidad de regiones adecuadas para unirse a dicho péptido, estando dicha pluralidad de regiones unidas covalentemente.
- 5 10. La composición según la reivindicación 9, en la que dicha pluralidad de regiones están unidas directamente, o indirectamente.
11. La composición según la reivindicación 1, en la que cada uno de dichos ligandos está cargado positivamente y en la que dicha macromolécula portadora está cargada negativamente.
- 10 12. La composición según la reivindicación 1, en la que cada uno de dichos ligandos está cargado negativamente y en la que dicha macromolécula portadora está cargada positivamente.
- 15 13. La composición según la reivindicación 1, en la que cada uno de dichos ligandos está cargado positivamente y en la que dicha macromolécula portadora es carboximetilcelulosa.
14. La composición según la reivindicación 1, en la que cada uno de dichos ligandos comprende una secuencia de unión y una secuencia cargada positivamente, y en la que dicha macromolécula portadora está cargada negativamente.
- 20 15. La composición según la reivindicación 12, en la que la macromolécula portadora está seleccionada del grupo que consiste en poli-L-lisina y poli-L-arginina, dietilaminoetil dextrano, dietilaminoetil celulosa, y poli(d-glucosamina).
16. La composición según la reivindicación 14, en la que la secuencia cargada positivamente es una poli(arginina).
- 25 17. La composición según la reivindicación 14, en la que la secuencia cargada positivamente es una poli(d-arginina).
18. La composición según la reivindicación 1, en la que cada uno de dichos ligandos comprende una secuencia de aminoácidos que lleva una carga electrónica neta que es una poli(lisina).
- 30 19. La composición según la reivindicación 1, en la que cada uno de dichos ligandos comprende una secuencia de aminoácidos que lleva una carga electrónica neta que es un poli(L-glutamato).

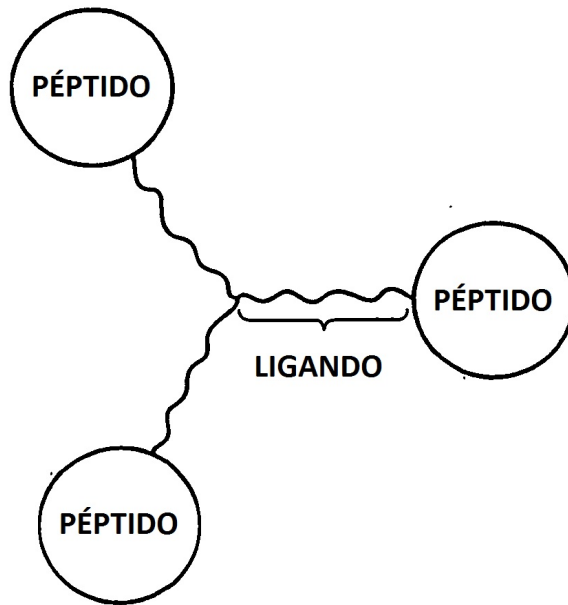


Fig. 1A

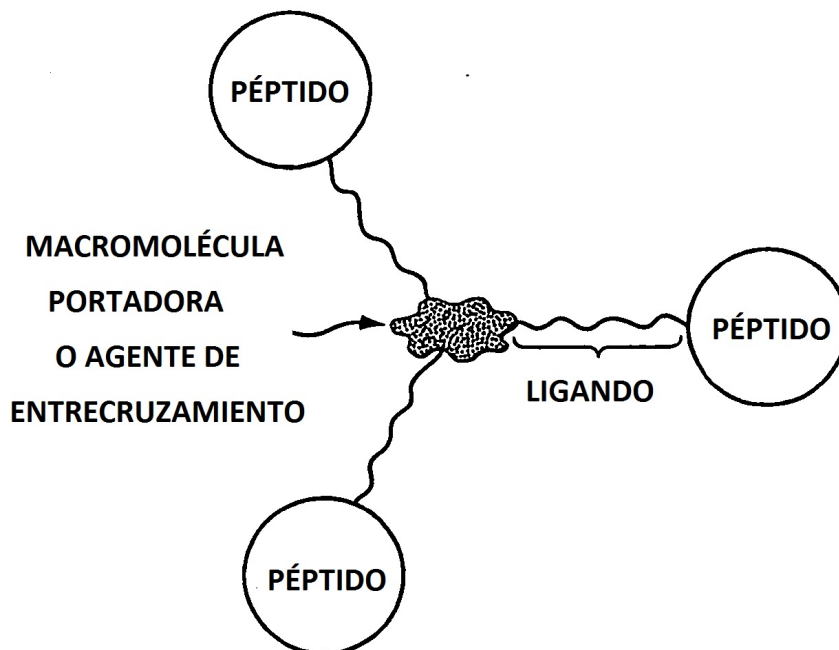


Fig. 1B

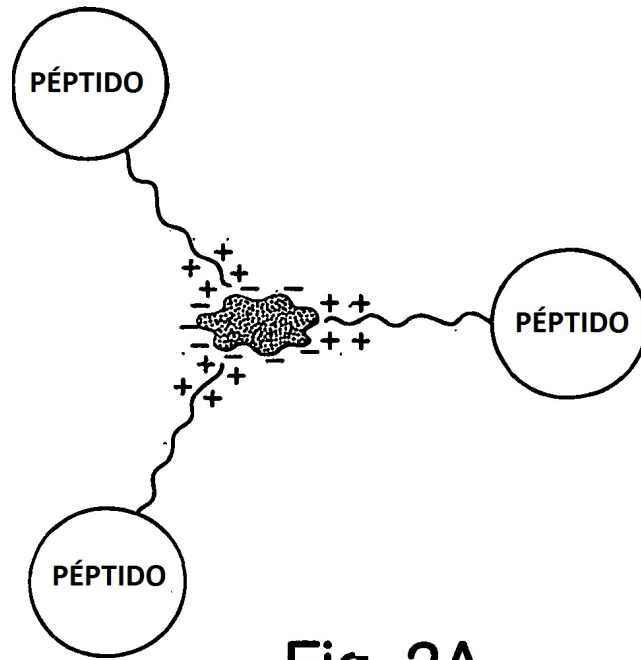


Fig. 2A

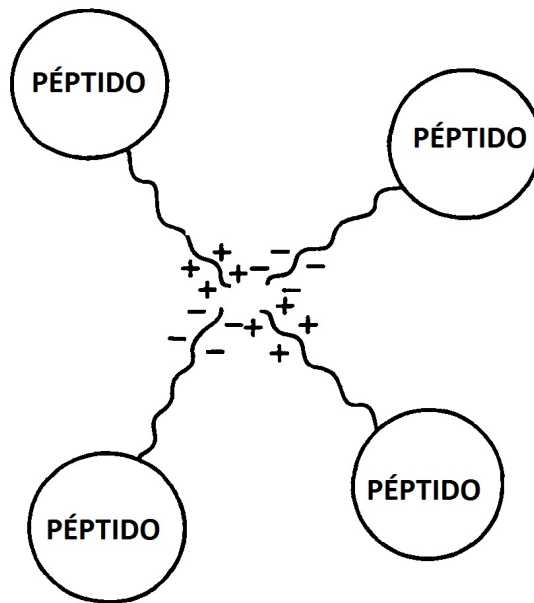


Fig. 2B