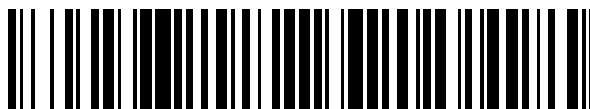


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 572**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16 (2006.01)
A61K 9/28 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01)
B01J 13/10 (2006.01)
B05D 1/20 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2006 E 06851461 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014 EP 1957050**

54 Título: **Películas de polipéptidos y métodos**

30 Prioridad:

14.11.2005 US 736723 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2014

73 Titular/es:

**LOUISIANA TECH UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION (100.0%)
A DIVISION OF LOUISIANA, TECH UNIVERSITY
FOUNDATION INC. 900 TECH DRIVE
RUSTON LA 71270, US**

72 Inventor/es:

**HAYNIE, DONALD, TEMPLETON y
ZHI, ZHENG-LIANG**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 444 572 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

Películas de polipéptidos y métodos

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a la fabricación de películas y microcápsulas de polipéptidos producidas por nanoingeniería, y a métodos para preparar y usar tales películas y microcápsulas. Más específicamente, la presente invención se refiere a la encapsulación de biomacromoléculas funcionales en microcápsulas de polipéptidos producidas por nanoingeniería.

Antecedentes de la invención

10 Las películas multicapas de polielectrolitos son películas finas (p.ej., de unos nanómetros a milímetros de grosor) compuestas de capas alternantes de polielectrolitos cargados opuestamente. Tales películas pueden ser formadas por ensamblaje capa a capa sobre un sustrato adecuado. En el autoensamblaje electrostático capa a capa ("ELBL", por sus siglas en inglés), la base física de asociación de polielectrolitos es la electrostática. La construcción de películas es posible porque el signo de la densidad de carga superficial de la película se invierte con la deposición de capas sucesivas. El principio general de la deposición ELBL de poliones cargados opuestamente se ilustra en la

15 Figura 1. La generalidad y simplicidad relativa del procedimiento ELBL permite la deposición de muchos tipos diferentes de polielectrolitos sobre muchos tipos diferentes de superficie. Las películas multicapas de polipéptidos son un subconjunto de películas multicapas de polielectrolitos, que comprenden al menos una capa que comprende un polipéptido cargado. Una ventaja clave de las películas multicapas de polipéptidos es su benignidad medioambiental. Las películas ELBL también se pueden usar para encapsulación. Las aplicaciones de las películas

20 de polipéptidos y microcápsulas incluyen, por ejemplo, nano-reactores, biosensores, células artificiales y vehículos de entrega de fármacos.

Los principios de diseño para la incorporación de polipéptidos en películas multicapas fueron elucidados por primera vez en la publicación de patente de EE.UU. Nº 20050069950. Brevemente, la idoneidad de un polipéptido para ELBL está relacionada con la carga neta sobre el polipéptido y la longitud del polipéptido. Un polipéptido adecuado para

25 ELBL comprende preferiblemente uno o más motivos de secuencia de aminoácidos, esto es, secuencias de aminoácidos contiguos que tienen una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 residuos de aminoácidos y que tienen una densidad de carga lineal adecuada para la deposición electrostática. Un polipéptido para ELBL se puede diseñar de diferentes maneras, por ejemplo, uniendo una pluralidad de motivos de secuencias de aminoácidos unos a otros, bien directamente o bien mediante un enlazante. Se pueden depositar fácilmente

30 polipéptidos que tienen la longitud y propiedades de carga apropiadas para formar una o más capas de una película multicapas de polipéptido.

Las proteínas, péptidos y oligonucleótidos pueden ser potentes agentes terapéuticos. Tales biomoléculas, sin embargo, son dianas de diversos mecanismos de degradación in vivo. La encapsulación de biomoléculas y otras

35 moléculas bioactivas dentro de un microentorno biocompatible, para la preservación extendida de la función o la liberación controlada, es una estrategia para mejorar la disponibilidad de las moléculas bioactivas en sitios fijados como diana. La deposición de una película de polipéptido sobre un sustrato revestido con una biomolécula podría extender de manera similar la preservación de la función o la liberación controlada de la biomolécula. El nanoensamblaje electrostático capa a capa es un medio para preparar películas multicapas y microcápsulas de polielectrolitos de alta estabilidad y permeabilidad mejorable.

40 Sigue habiendo una necesidad de medios alternativos para conseguir una retención directa y eficaz de macromoléculas bioactivas funcionales, por ejemplo una proteína, en películas y microcápsulas de polipéptidos biodegradables producidas por ingeniería.

Compendio de la invención

Se describe en la presente memoria un método para preparar una película que comprende depositar un

45 polielectrolito de primera capa sobre una superficie de un sustrato para formar una primera capa; y depositar un polielectrolito de segunda capa sobre el polielectrolito de primera capa para formar una segunda capa. El polielectrolito de primera capa, el polielectrolito de segunda capa, o ambos, se deposita sobre el sustrato en presencia de un precipitante polimérico; y el polielectrolito de primera capa y el polielectrolito de segunda capa tienen cargas netas de polaridad opuesta. También se describe que el polielectrolito de primera capa, el

50 polielectrolito de segunda capa, o ambos, comprende un homopolipéptido de lisina, ácido glutámico, y otro tipo de aminoácido que tenga una cadena lateral cargada a pH neutro. Adicionalmente, se describe que el polielectrolito de primera capa, el polielectrolito de segunda capa, o ambos, comprende un polipéptido diseñado, en donde el polipéptido diseñado comprende uno o más primeros motivos de secuencia de aminoácidos, en donde el uno o más primeros motivos de secuencia de aminoácidos consiste en 5 a 15 residuos de aminoácidos y tiene una magnitud de

55 carga neta por residuo mayor que o igual a 0,4, y en donde el polipéptido diseñado no es un homopolipéptido, es al menos de 15 residuos de aminoácidos de largo, y tiene una magnitud de carga neta por residuo mayor que o igual a 0,4.

Se describe un método para mejorar la retención de moléculas bioactivas durante la fabricación de una película multicapas de polielectrolitos, que comprende depositar un polielectrolito de primera capa sobre una superficie de un sustrato para formar una primera capa; y depositar un polielectrolito de segunda capa sobre el polielectrolito de primera capa para formar una segunda capa. El polielectrolito de primera capa, el polielectrolito de segunda capa, o ambos, se deposita sobre el sustrato en presencia de un precipitante polimérico; el polielectrolito de primera capa y el polielectrolito de segunda capa tienen cargas netas de polaridad opuesta; y el sustrato comprende una molécula bioactiva.

Así, la presente invención proporciona un método para preparar una película, comprendiendo el método bien:

a) depositar un polielectrolito de primera capa sobre una superficie de un sustrato para formar una primera capa; y depositar un polielectrolito de segunda capa sobre el polielectrolito de primera capa para formar una segunda capa;

en donde (i) el polielectrolito de primera capa, el polielectrolito de segunda capa, o ambos, se deposita sobre el sustrato en presencia de un precipitante polimérico;

(ii) el polielectrolito de primera capa y el polielectrolito de segunda capa tienen cargas netas de polaridad opuesta; y

(iii) el polipéptido de primera capa, el polipéptido de segunda capa, o ambos, se deposita en presencia de una molécula bioactiva y/o el sustrato comprende una molécula bioactiva;

o bien

b) depositar una molécula bioactiva sobre la superficie de un sustrato en presencia de un precipitante polimérico;

depositar un polielectrolito de primera capa sobre una superficie del sustrato para formar una primera capa; y depositar un polielectrolito de segunda capa sobre el polielectrolito de primera capa para formar una segunda capa;

en donde el polielectrolito de primera capa y el polielectrolito de segunda capa tienen cargas netas de polaridad opuesta.

Los rasgos descritos anteriormente y otros se ilustran mediante las siguientes figuras y descripción detallada.

Dibujos

Haciendo referencia ahora a las figuras, que son realizaciones ilustrativas:

La Figura 1 muestra un diagrama esquemático del ensamblaje de polipéptidos cargados opuestamente.

La Figura 2 muestra la capacidad de adsorción de glucosa oxidasa (GOx) sobre plantillas de partículas de CaCO_3 o melamina formaldehído (MF) en función de la concentración de la enzima y la concentración de NaCl.

La Figura 3 muestra la pérdida de GOx adsorbida de plantillas de CaCO_3 durante la deposición de una película encapsulante de poli(L-lisina)/poli(ácido L-glutámico) (PLL/PLGA) como absorbancia a 280 nm debida a la GOx liberada presente en el lavado, tampón de ensamblaje de poli(L-lisina) (PLL), o tampón de ensamblaje de poli(ácido L-glutámico) (PLGA) en ausencia de un precipitante polimérico, en presencia de PEG 300 al 40%, o en presencia de PEG 300 al 50%.

La Figura 4 muestra la retención de GOx sobre plantillas de CaCO_3 durante la deposición de una película encapsulante de (PLL)/(PLGA) en presencia o ausencia de PEG 300 al 50% en las disoluciones de deposición.

La Figura 5 muestra el esquema de reacción para la medición fotométrica de la actividad de GOx en una microcápsula de polipéptido.

La Figura 6 muestra la actividad medida de GOx encapsulada en función del número de capas de polipéptido.

La Figura 7 muestra (a) Imagen de microscopía confocal de microcápsulas después de la disolución de la plantilla. Izquierda, fluorescencia; derecha, campo brillante. (b) Perfil de intensidad de fluorescencia de una cápsula. Izquierda, cápsula cargada; derecha, núcleo revestido antes de la disolución de la plantilla.

Descripción detallada de la invención

La presente invención está dirigida a métodos para preparar películas multicapas de polielectrolitos. Se discuten películas que comprenden una molécula bioactiva. Además, las películas multicapas de polielectrolitos comprenden una o mas capas de polipéptidos.

Por tanto, la presente invención proporciona un método para preparar una película, comprendiendo el método bien:

a) depositar un polielectrolito de primera capa sobre una superficie de un sustrato para formar una primera capa; y depositar un polielectrolito de segunda capa sobre el polielectrolito de primera capa para formar una segunda capa;

en donde (i) el polielectrolito de primera capa, el polielectrolito de segunda capa, o ambos, se deposita sobre el sustrato en presencia de un precipitante polimérico;

(ii) el polielectrolito de primera capa y el polielectrolito de segunda capa tienen cargas netas de polaridad opuesta; y

5 (iii) el polipéptido de primera capa, el polipéptido de segunda capa, o ambos, se deposita en presencia de una molécula bioactiva y/o el sustrato comprende una molécula bioactiva;

o bien

b) depositar una molécula bioactiva sobre la superficie de un sustrato en presencia de un precipitante polimérico;

depositar un polielectrolito de primera capa sobre una superficie del sustrato para formar una primera capa; y depositar un polielectrolito de segunda capa sobre el polielectrolito de primera capa para formar una segunda capa;

10 en donde el polielectrolito de primera capa y el polielectrolito de segunda capa tienen cargas netas de polaridad opuesta.

15 Como se emplea en la presente memoria, "capa" significa un incremento de grosor, p.ej., sobre un sustrato para la formación de película, después de una etapa de adsorción. "Multicapas" significa incrementos de grosor múltiples (es decir, dos o más). Una "película de polielectrolito multicapas" es una película que comprende uno o más incrementos de grosor de polielectrolitos. Después de la deposición, las capas de una película multicapas pueden no permanecer como capas discretas. De hecho, es posible que haya una entremezcla significativa de especies, particularmente en las interfaces de los incrementos de grosor.

20 El término "polielectrolito" incluye materiales policatiónicos y polianiónicos que tienen un peso molecular mayor que 1.000 y al menos 5 cargas por molécula. Los materiales policatiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, poliaminas. Las poliaminas incluyen, por ejemplo, un polipéptido, polivinilamina, poli(aminoestireno), poli(aminoacrilato), poli(N-metilaminoacrilato), poli(N-etilaminoacrilato), poli(N,N-dimetilaminoacrilato), poli(N,N-dietilaminoacrilato), poli(aminometacrilato), poli(N-metilaminometacrilato), poli(N-etilaminometacrilato), poli(N,N-dimetilaminometacrilato), poli(N,N-dietilaminometacrilato), poli(etilenimina), poli(cloruro de dialildimetilamonio), poli(cloruro de N,N,N-trimetilaminoacrilato), poli(cloruro de metacrilamidopropiltrimetilamonio), chitosán y combinaciones que comprenden uno o más de los materiales policatiónicos anteriores. Los materiales polianiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, un polipéptido, un ácido nucleico, alginato, carragenina, furcellaran, pectina, xantana, ácido hialurónico, heparina, sulfato de heparán, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, sulfato de dextrano, poli(ácido (met)acrílico), celulosa oxidada, carboximetilcelulosa, polisacáridos ácidos, y croscarmelosa, polímeros y copolímeros sintéticos que contienen grupos carboxilo colgantes, y combinaciones que comprenden uno o más de los materiales polianiónicos anteriores.

"Aminoácido" significa un bloque constructor de un polipéptido. Como se emplea en la presente memoria, "aminoácido" incluye los 20 L-aminoácidos comunes que existen en la naturaleza, todos los demás aminoácidos naturales, todos los aminoácidos no naturales, y todas las especies miméticas de aminoácidos, p.ej., peptoides.

35 "Aminoácido que existe en la naturaleza" significa los 20 L-aminoácidos comunes que existen en la naturaleza, esto es, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, cisteína, metionina, ácido aspártico, asparraguina, ácido glutámico, glutamina, arginina, lisina, histidina, fenilalanina, tirosina, triptófano y prolina.

"Aminoácido no natural" significa un aminoácido distinto a los 20 L-aminoácidos comunes que existen en la naturaleza. Un aminoácido no natural puede tener estereoquímica L o bien D.

40 "Peptoides", o glicina N-sustituida, significa un análogo del monómero aminoácido correspondiente, con la misma cadena lateral que el correspondiente aminoácido pero con la cadena lateral adjuntada al átomo de nitrógeno del grupo amino en vez de a los carbonos α del residuo. Por consiguiente, los enlaces químicos entre monómeros en un polipeptoides no son enlaces peptídicos, lo que puede ser útil para limitar la digestión proteolítica.

"Secuencia de aminoácidos" y "secuencia" significan un tramo contiguo de cadena de polipéptido que es al menos de dos residuos aminoácidos de largo.

45 "Residuo" significa un aminoácido en un polímero u oligómero; es el residuo del monómero aminoácido a partir del cual se formó el polímero. La síntesis de polipéptidos implica deshidratación, esto es, se "pierde" una única molécula de agua en la adición del aminoácido a una cadena de polipéptido.

50 "Motivo de secuencia de aminoácidos" significa una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende n residuos, en donde n es 5 a 15. En una realización, la magnitud de la carga neta por residuo de un motivo de secuencia de aminoácidos es mayor que o igual a 0,4. En otra realización, la magnitud de la carga neta por residuo de un motivo de secuencia de aminoácidos es mayor que o igual a 0,5. Como se emplea en la presente memoria, la magnitud de la carga neta se refiere al valor absoluto de la carga neta, esto es, la carga neta puede ser positiva o negativa.

"Polipéptido diseñado" significa un polipéptido que comprende uno o más motivos de secuencia de aminoácidos, en

donde el polipéptido es al menos de 15 aminoácidos de longitud y la relación del número de residuos cargados de la misma polaridad menos el número de residuos de polaridad opuesta al número total de residuos en el polipéptido es mayor que o igual a 0,4 a pH 7,0. En otras palabras, la magnitud de la carga neta por residuo del polipéptido es mayor que o igual a 0,4. En una realización, la relación del número de residuos cargados de la misma polaridad menos el número de residuos de polaridad opuesta al número total de residuos en el polipéptido es mayor que o igual a 0,5 a pH 7,0. En otras palabras, la magnitud de la carga neta por residuo del polipéptido es mayor que o igual a 0,5. Aunque no hay límite absoluto sobre la longitud del polipéptido, en general, los polipéptidos diseñados adecuados para deposición ELBL tienen un límite superior práctico de longitud de 1.000 residuos.

“Estructura primaria” significa la secuencia lineal contigua de aminoácidos en una cadena de polipéptido, y “estructura secundaria” significa los tipos más o menos regulares de estructura en una cadena de polipéptido estabilizada por interacciones no covalentes, usualmente enlaces de hidrógeno. Los ejemplos de estructura secundaria incluyen hélice α , lámina β y giro β .

“Película multicapas de polipéptido” significa una película que comprende uno o más polipéptidos tales como los polipéptidos diseñados definidos anteriormente. Por ejemplo, una película multicapas de polipéptido comprende una primera capa que comprende un polipéptido diseñado y una segunda capa que comprende un polielectrolito que tiene una carga neta de polaridad opuesta al polipéptido diseñado. Por ejemplo, si la primera capa tiene una carga neta positiva, la segunda capa tiene una carga neta negativa; y si la primera capa tiene una carga neta negativa, la segunda capa tiene una carga neta positiva. La segunda capa comprende otro polipéptido diseñado u otro polielectrolito.

“Sustrato” significa un material sólido con una superficie adecuada para la adsorción de polielectrolitos de una solución acuosa. La superficie de un sustrato puede tener esencialmente cualquier forma, por ejemplo, plana, esférica, con forma de barra, y similares. La superficie del sustrato es regular o irregular. Un sustrato puede ser un cristal. Un sustrato incluye opcionalmente moléculas bioactivas. Los sustratos varían en tamaño desde la nanoescala hasta la macroescala. Además, un sustrato comprende opcionalmente varias subpartículas pequeñas. Un sustrato puede estar hecho de material orgánico, material inorgánico, material bioactivo, o una combinación de los mismos. Ejemplos no limitantes de sustratos incluyen obleas de silicio; partículas coloidales cargadas, p.ej., micropartículas de CaCO_3 o de melamina formaldehído; cristales de proteínas; cristales de ácidos nucleicos; cristales de fármacos; células biológicas tales como eritrocitos, hepatocitos, células bacterianas, o células de levaduras; látices poliméricos orgánicos, p.ej., látices de poliestireno o copolímeros de estireno; liposomas; orgánulos; y virus. En una realización, un sustrato es un dispositivo médico tal como un marcapasos artificial, un implante coclear, o una endoprótesis vascular (“stent”).

Cuando un sustrato es desintegrado o eliminado de otro modo durante o después de la formación de la película, se llama “una plantilla” (para formación de películas). Las partículas plantilla pueden ser disueltas en disolventes apropiados o eliminadas por tratamiento térmico. Si, por ejemplo, se usan partículas plantilla de melamina formaldehído parcialmente reticuladas, la plantilla puede ser desintegrada por métodos químicos suaves, p.ej., en DMSO, o por un cambio en el valor de pH. Después de la disolución de las partículas plantilla, quedan cortezas multicapas huecas que están compuestas de capas de polielectrolitos alternantes.

Una “microcápsula” es una película de polielectrolito en la forma de una corteza hueca o un revestimiento que rodea a un núcleo. El término núcleo significa por tanto el interior de una microcápsula. El núcleo comprende diversos encapsulantes diferentes, tales como una proteína, un fármaco, o una combinación de los mismos, en forma líquida o cristalina, por ejemplo.

“Molécula bioactiva” significa una molécula, macromolécula o ensamblaje macromolecular que tiene un efecto biológico. El efecto biológico específico se puede medir en un ensayo adecuado y normalizar por unidad de peso o por molécula de la molécula bioactiva. Una molécula bioactiva puede ser encapsulada, retenida detrás de, o encapsulada dentro de una película de polielectrolito. Son ejemplos no limitantes de una molécula bioactiva un fármaco, un cristal de un fármaco, una proteína, un fragmento funcional de una proteína, un complejo de proteínas, una lipoproteína, un oligopéptido, un oligonucleótido, un ácido nucleico, un ribosoma, un agente terapéutico activo, un fosfolípido, un polisacárido, un lipopolisacárido. Como se emplea en la presente memoria, “molécula bioactiva” abarca además estructuras biológicamente activas, tales como, por ejemplo, un fragmento de membrana funcional, una estructura de membrana, un virus, un patógeno, una célula, un agregado de células, y un orgánulo. Los ejemplos de una proteína que puede ser encapsulada o retenida detrás de una película de polipéptido son la hemoglobina; enzimas, tales como por ejemplo glucosa oxidasa, ureasa, lisozima y similares; proteínas matriciales extracelulares, por ejemplo, fibronectina, laminina, vitronectina y colágeno; y un anticuerpo. Los ejemplos de una célula que puede ser encapsulada o retenida detrás de una película de polielectrolito son una célula islote transplantada, una célula eucariótica, una célula bacteriana, una célula vegetal, y una célula de levadura.

“Biocompatible” significa que no causa efecto adverso sustancial sobre la salud tras ingestión oral, aplicación tópica, aplicación transdérmica, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inhalación, implantación o inyección intravenosa. Por ejemplo, las películas biocompatibles incluyen las que no causan una respuesta inmunitaria sustancial cuando están en contacto con el sistema inmunitario de, por ejemplo, un ser humano.

“Respuesta inmunitaria” significa la respuesta del sistema inmunitario celular o humoral a la presencia de una sustancia en cualquier lugar del cuerpo. Una respuesta inmunitaria se puede caracterizar de varias maneras por ejemplo, mediante un aumento en la corriente sanguínea del número de anticuerpos que reconocen un cierto antígeno. Los anticuerpos son proteínas secretadas por los linfocitos B, y un antígeno es una entidad que provoca una respuesta inmunitaria. El cuerpo humano lucha contra la infección e inhibe la reinfección aumentando el número de anticuerpos en la corriente sanguínea y otras partes. La respuesta inmunitaria específica depende en cierta medida del individuo, aunque son la norma unos patrones generales de respuesta.

“Epítipo” significa la estructura o secuencia de una proteína que es reconocida por un anticuerpo. Habitualmente un epítipo estará en la superficie de una proteína. Un “epítipo continuo” es uno que implica varios residuos de aminoácidos contiguos, no uno que implica residuos de aminoácidos que están casualmente en contacto o en la región del espacio limitada en una proteína plegada.

“Precipitante polimérico” significa un compuesto químico tal como un polímero soluble que afecta a la solubilidad de una molécula bioactiva. En una realización, un precipitante polimérico significa un polímero soluble en agua que disminuye la solubilidad en agua de una molécula bioactiva adsorbida sobre una plantilla y/o la solubilidad en agua de un polielectrolito usado en la fabricación de una película sobre una plantilla. En disolución acuosa, el precipitante polimérico atrae las moléculas de agua disolventes lejos de la superficie de una plantilla revestida con la molécula bioactiva, disminuyendo eficazmente la solubilidad de la molécula bioactiva en disolución acuosa masiva, y aumentando de este modo la cantidad de la molécula bioactiva que es retenida sobre la plantilla durante el proceso de ensamblaje de la película de polielectrolito. El precipitante polimérico también puede tener una influencia favorable sobre la estabilidad de la cápsula durante la disolución de la plantilla cambiando el gradiente de presión osmótica a través de la pared de la cápsula.

Son ejemplos no limitantes de un precipitante polimérico el polietilenglicol (PEG), poli(ácido acrílico) (sal de sodio), poli(alcohol vínfico) (PVA), polivinilpirrolidona, polipropilenglicol (PPG), dietilaminoetildextrano, polietilenimina (PEI), y combinaciones que comprenden uno o más de los precipitantes poliméricos anteriores. El peso molecular preferido del precipitante polimérico variará de polímero a polímero. Se debe hacer notar que el peso molecular es un fuerte determinante de la solubilidad de un precipitante polimérico, de tal manera que cuanto más alto es el peso molecular, más baja es la solubilidad. Valores prácticos de peso molecular para algunos de los polímeros mencionados para uso como precipitantes poliméricos de biomacromoléculas son 425 Da para el PPG, 5.000 Da para el PVA, y 40 a 60 kDa para el PEI. Están disponibles en la bibliografía científica detalles adicionales sobre la solubilidad de tales polímeros.

Se describe en la presente memoria un método para preparar una película multicapas. El método comprende depositar una pluralidad de capas de polielectrolitos cargados opuestamente sobre un sustrato. La deposición de al menos uno de los polielectrolitos cargados opuestamente se realiza en presencia de un precipitante polimérico. En algunas realizaciones, la deposición es por ensamblaje capa a capa (LBL). Las capas depositadas sucesivamente tienen signos opuestos de carga neta. La una o más capas pueden comprender un polipéptido diseñado. Además, al menos uno de los polipéptidos cargados opuestamente puede comprender un homopolipéptido tal como poli(L-lisina) o poli(ácido L-glutámico).

Los principios de diseño para polipéptidos adecuados para la deposición electrostática capa a capa se esclarecen en la publicación de patente de EE.UU. N° 2005/0069950.

Brevemente, los problemas principales del diseño son la longitud y la carga del polipéptido. La electrostática es el problema de diseño más importante, porque es la base del ELBL. Sin propiedades de carga adecuadas, un polipéptido no será sustancialmente soluble en disolución acuosa a pH 4 a 10 y no se puede usar fácilmente para la fabricación de una película multicapas por ELBL. Otros problemas de diseño incluyen la estructura física de los polipéptidos, la estabilidad física de las películas formadas a partir de los polipéptidos, y la biocompatibilidad y bioactividad de las películas y los polipéptidos constituyentes.

Como se definió anteriormente, un polipéptido diseñado significa un polipéptido que comprende uno o más motivos de secuencia de aminoácidos, en donde el polipéptido es al menos de 15 residuos de aminoácidos de longitud y la magnitud de la carga neta por residuo del polipéptido es mayor que o igual a 0,4 a pH 7,0. “Motivo de secuencia de aminoácidos” significa una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende n residuos de aminoácidos, en donde n es 5 a 15. Los aminoácidos existentes en la naturaleza cargados positivamente (básicos) a pH 7,0 son Arg, His y Lys. Los residuos de aminoácidos existentes en la naturaleza cargados negativamente (ácidos) a pH 7,0 son Glu y Asp. Se puede emplear un motivo de aminoácidos que comprende una mezcla de residuos de aminoácidos de carga opuesta, siempre y cuando la proporción global de carga cumpla los criterios especificados. Un polipéptido diseñado puede no ser un homopolipéptido.

En un ejemplo, el motivo de secuencia de aminoácidos comprende 7 residuos de aminoácidos. Cuatro residuos de aminoácidos cargados es un mínimo adecuado para un tamaño de motivo de 7, porque menos que 4 cargas da una solubilidad del péptido disminuida y un control disminuido sobre la ELBL. Además, con respecto a la biocompatibilidad, cada motivo de secuencia de aminoácidos identificado en los datos genómicos es lo suficientemente largo a 7 residuos de aminoácidos para constituir un epítipo continuo, pero no tan largo como para

corresponder sustancialmente a residuos tanto en la superficie de una proteína como en su interior. Por tanto, la carga y longitud del motivo de secuencia de aminoácidos ayudan a asegurar que un motivo de secuencia de aminoácidos identificado en los datos genómicos sea propenso a aparecer en la superficie de la proteína plegada a partir de la que deriva el motivo de secuencia. En contraste, un motivo muy corto podría parecerle al cuerpo una secuencia aleatoria, o una no específicamente “propia”, y por lo tanto provocar una respuesta inmunitaria.

En algunos casos, un problema de diseño con respecto a los motivos de secuencia de aminoácidos y los polipéptidos diseñados es su propensión a formar estructuras secundarias, notablemente hélice α o lámina β . En algunos casos, es deseable poder controlar, p.ej., minimizar, la formación de estructuras secundarias por los polipéptidos diseñados en un medio acuoso, a fin de maximizar el control sobre la formación de capas de película finas. Primero, se prefiere que los motivos de secuencia sean relativamente cortos, esto es, de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 residuos de aminoácidos, porque los motivos largos son más propensos a adoptar una estructura tridimensional estable en disolución. Segundo, un enlazante, tal como un residuo de glicina o prolina, unido covalentemente entre motivos de secuencia de aminoácidos sucesivos en un polipéptido diseñado, reducirá la propensión del polipéptido a adoptar estructura secundaria en disolución. La glicina, por ejemplo, tiene una propensión a hélices α muy baja y una propensión a láminas β muy baja, haciendo energéticamente muy desfavorable para una glicina y sus aminoácidos vecinos formar estructura secundaria regular en disolución acuosa. Tercero, la propensión a hélices α y láminas β de los propios polipéptidos diseñados puede ser minimizada seleccionando motivos de secuencia de aminoácidos para los que la propensión a hélices α sumada sea menos que 7,5 y la propensión a láminas β sumada sea menos que 8. Propensión “sumada” significa la suma de las propensiones a hélices α o láminas β de todos los aminoácidos en un motivo. Los motivos de secuencia de aminoácidos que tienen una propensión a hélices α sumada y/o propensión a láminas β sumada algo más altas son adecuados para EBL, particularmente cuando están unidos por enlazantes tales como Gly o Pro. En ciertas aplicaciones, la propensión de un polipéptido a formar estructura secundaria puede ser relativamente alta como rasgo específico de diseño de la fabricación de películas finas. Las propensiones a estructura secundaria para todos los 20 aminoácidos existentes en la naturaleza pueden ser calculadas usando el método de Chou y Fasman (véase P. Chou y G. Fasman, *Biochemistry*, 13:211 (1974), que se incorpora por referencia en la presente memoria en su totalidad).

Otro problema de diseño es el control de la estabilidad de las películas EBL de polipéptidos. Los enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals e interacciones hidrófobas contribuyen a la estabilidad de las películas multicapas. Además, los enlaces disulfuro covalentes formados entre aminoácidos que contienen sulfhidrilo en los polipéptidos dentro de la misma capa o en capas adyacentes pueden aumentar la fuerza estructural. Los aminoácidos que contienen sulfhidrilo incluyen cisteína y homocisteína. Además, se puede añadir un sulfhidrilo a β -aminoácidos tales como ácido D,L- β -amino- β -ciclohexilpropiónico; ácido D,L-3-aminobutanoico; o ácido 5-(metiltio)-3-aminopentanoico. Se pueden usar aminoácidos que contienen sulfhidrilo para “bloquear” (unir entre sí) y “desbloquear” capas de una película de polipéptido multicapas mediante un cambio en el potencial de oxidación. También, la incorporación de un aminoácido que contiene sulfhidrilo en un motivo de secuencia de un polipéptido diseñado permite el uso de péptidos relativamente cortos en la fabricación de películas finas, en virtud de la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. Se pueden seleccionar motivos de secuencia de aminoácidos que contienen aminoácidos que contienen sulfhidrilo a partir de una librería de motivos identificados usando los métodos descritos a continuación, o diseñarse *de novo*.

En un caso, los polipéptidos que contienen sulfhidrilo diseñados, ya sean sintetizados químicamente o producidos en un organismo huésped, se ensamblan mediante EBL en presencia de un agente reductor para impedir la formación prematura de enlaces disulfuro. Después de este ensamblaje, se retira el agente reductor y se añade un agente oxidante. En presencia del agente oxidante se forman enlaces disulfuro entre grupos sulfhidrilo, “bloqueando” de este modo entre sí los polipéptidos dentro de capas y entre capas donde están presentes grupos tiol. Los agentes reductores adecuados incluyen ditioneitol (“DTT”), 2-mercaptoetanol (2-ME), glutatión reducido, hidrócloruro de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), y combinaciones de más que uno de estos compuestos químicos. Los agentes oxidantes adecuados incluyen glutatión oxidado, hidroperóxido de terc-butilo (t-BHP), timerosal, diamida, ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitro-benzoico) (DTNB), 4,4'-ditiodipiridina, bromato de sodio, peróxido de hidrógeno, tetratiónato de sodio, porfirindina, ortoyodoisobenzoato de sodio, y combinaciones de más que uno de estos compuestos químicos.

La biocompatibilidad es un problema de diseño en aplicaciones biomédicas. En tales aplicaciones, se usa información genómica o proteómica como base para el diseño de polímeros para dar, idealmente, polipéptidos “inertes para el sistema inmunitario”. El planteamiento será particularmente útil si el objeto fabricado o revestido hace contacto con la sangre circulante. Como los motivos de secuencia de aminoácidos son altamente polares, aparecen típicamente en la superficie de la forma plegada nativa de la proteína de la que derivan. La “superficie” es la parte de una proteína plegada que está en contacto con el disolvente o inaccesible al disolvente únicamente debido a la naturaleza granular del agua. Los motivos de secuencia de aminoácidos identificados en proteínas sanguíneas están siempre eficazmente en contacto con células y moléculas del sistema inmunitario mientras la proteína está en la sangre. Por lo tanto, los polipéptidos derivados de la superficie de proteínas sanguíneas plegadas son menos propensos a ser inmunogénicos que secuencias seleccionadas al azar. Los polipéptidos diseñados serán generalmente biocompatibles, pero el grado de respuesta inmunitaria o cualquier otro tipo de respuesta biológica bien puede depender de detalles específicos de un motivo de secuencia.

Se puede incorporar bioactividad a una película, revestimiento o microcápsula mediante varios métodos. Por ejemplo, un polipéptido diseñado que comprende la película puede comprender un dominio funcional. Alternativamente, la bioactividad puede estar asociada con otra molécula bioactiva encapsulada o revestida por la película fina de polipéptido. En una realización, la plantilla comprende una molécula bioactiva tal como un cristal de proteína.

Un dominio funcional en este contexto es una región independientemente termoestable de una proteína que tiene biofuncionalidad específica (p.ej., fosfotirosina de unión). En una proteína multidominio, pueden existir múltiples dominios funcionales, como por ejemplo en la proteína tensina, que abarca un dominio de unión de fosfotirosina y un dominio de proteína tirosina fosfatasa. La inclusión de un dominio funcional en un polipéptido diseñado incorporado en una película multicapas puede dotar a la película de una funcionalidad deseada, incluyendo, por ejemplo, unión específica a ligandos, fijación de objetivos in vivo, biodetección y biocatálisis.

La molécula bioactiva puede ser una proteína, un fragmento funcional de una proteína, un fragmento funcional de una proteína que no es parte de un polipéptido diseñado, un complejo de proteínas, un oligopéptido, un oligonucleótido, un ácido nucleico, un ribosoma, un agente terapéutico activo, un fosfolípido, un polisacárido, un lipopolisacárido, un fragmento de membrana funcional, una estructura de membrana, un virus, un patógeno, una célula, un agregado de células, un orgánulo, un lípido, un carbohidrato, un producto farmacéutico o un agente microbiano. La molécula bioactiva puede estar en la forma de un cristal bien ordenado o amorfo. La proteína puede ser una enzima o un anticuerpo. El sustrato puede comprender la molécula bioactiva. En una realización, el sustrato tiene una molécula bioactiva dispuesta en su superficie antes de la deposición de capas de polipéptidos cargados opuestamente. En otra realización, el sustrato es un cristal que comprende la molécula bioactiva.

En un caso, se diseñan motivos de secuencia de aminoácidos *de novo* o se seleccionan de la información genómica o proteómica de un organismo específico, tal como el genoma humano. Por ejemplo, se puede usar la estructura primaria del complemento C3 (gi|68766) o lactotransferrina (gi|4505043) para buscar motivos de secuencia de aminoácidos en una proteína sanguínea humana.

Un método para identificar un primer motivo de secuencia de aminoácidos en un polipéptido comprende seleccionar un residuo de aminoácido iniciador en el polipéptido; examinar una secuencia de aminoácidos que comprende el residuo de aminoácido iniciador y los siguientes $n-1$ residuos de aminoácidos en el polipéptido en cuanto a existencias de cargas positivas y negativas, en donde n es 5 a 15; determinar los 5 a 15 residuos aminoácidos como motivo de secuencia de aminoácidos si la carga neta de las cadenas laterales de los 5-15 residuos de aminoácidos a pH 7 es mayor que o igual a $0,4*n$; o descartar la secuencia si la carga neta de las cadenas laterales de los 5-15 residuos de aminoácidos a pH 7 es menor que $0,4*n$.

En un caso, el procedimiento de buscar datos de secuencia de proteínas en cuanto a un motivo de secuencia de aminoácidos cargado negativamente de longitud n que comprende sólo aminoácidos que son neutros o cargados negativamente se describe como sigue. Primero, se selecciona un primer residuo de aminoácido en una secuencia de proteína. Segundo, este residuo de aminoácido y los siguientes $n-1$ residuos de aminoácidos se examinan en cuanto a existencia de arginina (Arg), histidina (His) o lisina (Lys) (los tres aminoácidos existentes en la naturaleza que pueden estar cargados positivamente a pH neutro), donde n es 5 a 15. Tercero, si se encuentran uno o más residuos Arg, His o Lys en estos n residuos de aminoácidos, el procedimiento se empieza de nuevo en un segundo residuo de aminoácido. Si, por el contrario, no se encuentra Arg, His o Lys en estos n residuos, los n residuos se examinan para determinar el número de existencias de glutamato (Glu) y/o aspartato (Asp) (los dos aminoácidos cargados negativamente a pH neutro). Cuarto, si hay al menos $0,4*n$ existencias de Glu y/o Asp en los n residuos, la secuencia se cataloga como un motivo de secuencia de aminoácidos cargada negativamente. Sin, por el contrario, se encuentran menos que $0,4*n$ existencias de residuos de aminoácidos cargados negativamente, la secuencia que empieza con el primer residuo de aminoácido se descarta y el procedimiento se empieza de nuevo, por ejemplo, en un segundo residuo de aminoácido inmediatamente adyacente al primer residuo de aminoácido. Después de catalogar un motivo, el procedimiento puede empezar de nuevo en un segundo residuo de aminoácido.

El procedimiento para identificar un motivo de secuencia cargado positivamente es análogo a buscar datos de secuencia de proteínas en cuanto a una secuencia de aminoácidos de n residuos de largo que comprende sólo residuos de aminoácidos que son neutros o cargados positivamente, y para los cuales la magnitud de la carga neta de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos a pH neutro es mayor que o igual a $0,4*n$.

También análogo es el procedimiento para identificar un motivo de secuencia de aminoácidos cargado negativamente o un motivo de secuencia de aminoácidos cargado positivamente de longitud n , dejando tanto residuos de aminoácidos cargados positivamente como negativamente en el motivo. Por ejemplo, el procedimiento para identificar un motivo de secuencia de aminoácidos cargado positivamente de longitud n sería seleccionar un primer residuo de aminoácido en un polipéptido. Después, examinar este residuo de aminoácido y los siguientes residuos de $n-1$ aminoácidos en cuanto a existencia de residuos que están cargados positivamente o negativamente a pH 7. Determinar la carga neta de las cadenas laterales de los n residuos de aminoácidos. Si el valor absoluto de la carga neta es menos que $0,4*n$, entonces la secuencia se descarta y se empieza una nueva búsqueda en otro aminoácido, mientras que si el valor absoluto de la carga neta es mayor que o igual a $0,4*n$, entonces la secuencia es un motivo de secuencia de aminoácidos. El motivo será positivo si la carga neta es mayor que cero y negativo si

la carga neta es menor que cero.

El diseño *de novo* de motivos de secuencia de aminoácidos definido en la presente memoria sigue esencialmente reglas similares, excepto que las secuencias no están limitadas a las encontradas en la naturaleza. Se eligen una longitud de motivo n y un signo y magnitud de carga neta deseados. Después, se seleccionan n aminoácidos para el motivo de secuencia de aminoácidos que dan como resultado el signo y magnitud de carga deseados, con lo que el valor absoluto de la carga neta de los n aminoácidos sea mayor que o igual a $0,4*n$. Una ventaja potencial del diseño *de novo* de un motivo de secuencia de aminoácidos es que el experto puede seleccionar entre todos los aminoácidos (los 20 que existen en la naturaleza y todos los aminoácidos no naturales) para conseguir la carga neta deseada, en lugar de estar limitado a los aminoácidos encontrados en una secuencia proteica conocida particular. El mayor conjunto de aminoácidos aumenta el intervalo potencial de características físicas, químicas y/o biológicas que se pueden seleccionar al diseñar la secuencia del motivo en comparación con la identificación de un motivo de secuencia de aminoácidos en una secuencia genómica.

Un polipéptido diseñado como se define en la presente memoria comprenderá uno o más motivos de secuencia de aminoácidos. Se puede repetir el mismo motivo, o se pueden unir motivos diferentes al diseñar un polipéptido para ELBL. En un caso, los motivos de secuencia de aminoácidos están unidos covalentemente sin secuencia interviniente. En otro caso, un polipéptido diseñado comprende dos o más motivos de secuencia de aminoácidos unidos covalentemente por un enlazante. El enlazante puede estar basado en aminoácidos, p.ej., uno o más residuos de aminoácidos tales como glicina o prolina, o puede ser cualquier otro compuesto adecuado para enlazar covalentemente dos motivos de secuencia de aminoácidos. En un caso, un enlazante comprende 1-4 residuos de aminoácidos, por ejemplo, 1-4 residuos de glicina y/o prolina. El enlazante comprende una longitud o composición adecuada para que el polipéptido diseñado se mantenga a una magnitud de carga neta por residuo que sea mayor que o igual a 0,4.

En un caso, un polipéptido diseñado es mayor que o igual a 15 residuos de aminoácidos de largo. En otras realizaciones, un polipéptido diseñado es mayor que o igual a 18, 20, 25, 30, 32 o 35 aminoácidos de largo. 1.000 residuos es un límite superior práctico en la longitud del polipéptido.

Una vez que se han seleccionado o diseñado motivos de secuencia de aminoácidos *de novo*, se sintetiza un polipéptido diseñado con enlazantes basados en aminoácidos usando métodos bien conocidos en la técnica, tales como síntesis en fase sólida y química F-moc, o expresión heteróloga en bacterias siguiendo clonación y transformación de genes. Polipéptidos diseñados pueden ser sintetizados por una empresa de síntesis de péptidos, por ejemplo, SynPep Corp. (Dublín, California), producidos en el laboratorio usando un sintetizador de péptidos, o producidos por métodos de ADN recombinante. Cualquier desarrollo de métodos nuevos de síntesis de péptidos podría mejorar la producción de péptidos, pero no cambiaría fundamentalmente el diseño de péptidos descrito en la presente memoria.

Un método para preparar una película multicapas de polielectrolitos comprende depositar una pluralidad de capas de polielectrolitos cargados opuestamente sobre un sustrato. En un caso, al menos un polielectrolito comprende un polipéptido tal como un homopolipéptido cargado o un polipéptido diseñado. Los polielectrolitos depositados sucesivamente tendrán cargas netas opuestas. La Figura 1 es un diagrama esquemático que ilustra la deposición ELBL. En un caso, la deposición de un polipéptido diseñado (u otro polielectrolito) comprende exponer el sustrato a una disolución acuosa que comprende un polipéptido diseñado (u otro polielectrolito) a un pH al cual tiene una carga neta adecuada para ELBL. Alternativamente, la deposición de un polipéptido diseñado u otro polielectrolito sobre el sustrato se consigue por pulverización secuencial de disoluciones de polipéptidos cargados opuestamente o por pulverización simultánea de disoluciones de polielectrolitos cargados opuestamente.

En el método ELBL de formación de una película multicapas, las cargas opuestas de las capas adyacentes proporcionan la fuerza impulsora para el ensamblaje. No es crítico que los polielectrolitos en capas opuestas tengan la misma densidad de carga lineal neta, sólo que las capas opuestas tengan cargas opuestas. Un procedimiento de ensamblaje de películas estándar para deposición incluye formar disoluciones acuosas de los polielectrolitos a un pH en el que se ionicen (es decir, pH 4-10), proporcionando un sustrato que lleva una carga superficial, y alternar la inmersión del sustrato en las disoluciones de polielectrolito cargado. El sustrato se lava opcionalmente en medio de la deposición de capas alternantes.

La concentración de polielectrolito adecuada para la deposición del polielectrolito puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica. Un ejemplo de concentración es 0,1 a 10 mg/ml. Típicamente, el grosor de la capa producida es sustancialmente independiente de la concentración en disolución del polielectrolito durante la deposición en el intervalo establecido. Para polielectrolitos no polipeptídicos típicos tales como poli(ácido acrílico) y poli(hidrocloruro de alilamina), los grosores de capa son aproximadamente 3 a aproximadamente 5 Å, dependiendo de la fuerza iónica de la disolución. Los polielectrolitos cortos forman a menudo capas más finas que los polielectrolitos largos. Con respecto al grosor de las películas, el grosor de la película de polielectrolito depende de la humedad, así como del número de capas y composición de la película. Por ejemplo, las películas de PLL/PLGA de 50 nm de grosor se encogen a 1,6 nm tras un secado con nitrógeno. En general, se pueden formar películas de 1 nm a 100 nm o más de grosor dependiendo del estado de hidratación de la película y el peso molecular de los polielectrolitos empleados en el ensamblaje.

Además, el número de capas requerido para formar una película multicapas estable de polielectrolito dependerá de los polielectrolitos en la película. Para películas que comprenden sólo capas de polipéptidos de bajo peso molecular, una película tendrá típicamente 4 o más bicapas de polipéptidos cargados opuestamente. Para películas que comprenden polielectrolitos de alto peso molecular tales como poli(ácido acrílico) y poli(hidrocloreto de alilamina), pueden ser estables películas que comprenden una única bicapa de polielectrolito cargado opuestamente.

Como se describe en la presente memoria, se depositan uno o más polielectrolitos sobre el sustrato en presencia de un precipitante polimérico, típicamente en una disolución acuosa a pH 4 a 10. El uso de un precipitante polimérico, por ejemplo, minimiza ventajosamente la pérdida de moléculas bioactivas contenidas dentro de la película multicapas.

Para un conjunto dado de condiciones de deposición, se puede elegir la cantidad de un precipitante polimérico de un peso molecular particular para minimizar la pérdida de moléculas bioactivas adsorbidas a una plantilla sin hacer la viscosidad de la disolución de deposición inadecuada para el procedimiento de deposición particular. En general, una concentración adecuada de precipitante polimérico dependerá de la estructura molecular del precipitante y su peso molecular. En general, cuanto más alta es la concentración de precipitante polimérico, más alta es la insolubilidad de la macromolécula. Se pueden dar valores prácticos representativos de concentración de precipitante polimérico como sigue: para PEG de peso molecular 3.500 a 4.000 Da o PPG de peso molecular 425 Da o PVA de peso molecular 5.000 Da o PEI de peso molecular 40 a 60 kDa, 5-15% en peso. El PEG de 300 Da es considerablemente más soluble que el PEG de 3.500-4.000 Da; el primero puede ser soluble en disolución acuosa hasta aproximadamente 50% en peso. La concentración máxima útil de un precipitante particular disminuirá en relación con un aumento en concentración de un co-precipitante; por ejemplo, una concentración útil de PEG 300 será más baja si está presente PVA. Si el precipitante polimérico y la disolución de péptido es demasiado viscosa, no será posible controlar una buena pulverización. Con respecto a los métodos LBL, la viscosidad puede afectar a la velocidad de difusión de los polielectrolitos en las disoluciones de deposición, ralentizando el procedimiento de ensamblaje de películas. El equilibrio bajo cualquier conjunto particular de condiciones de deposición entre el efecto sobre la retención de la molécula bioactiva adsorbida y sobre la viscosidad de las disoluciones de deposición puede ser ponderado para determinar la concentración y peso molecular de otros polímeros útiles como precipitante polimérico.

Para el ejemplo de PEG como precipitante polimérico, se pueden usar concentraciones de disolución de hasta aproximadamente 50% (v/v) de PEG 300 en todo el intervalo de temperaturas donde la disolución permanece en estado líquido, nominalmente aproximadamente 0 a aproximadamente 100°C para el agua pura a aproximadamente 101,3 kPa (1 atm) de presión. Se puede emplear un intervalo algo más amplio de temperatura cuando el precipitante esté presente en disolución y la actividad funcional de la molécula bioactiva no es inactivada irreversiblemente. La concentración de un peso molecular particular de PEG que puede ser eficaz en estos métodos a un conjunto dado de condiciones de deposición es determinada al menos en parte por el mantenimiento de una viscosidad de disolución apropiada.

La película multicapas o microcápsula comprende una molécula bioactiva. En un caso, la molécula bioactiva es co-depositada con una o más capas de polielectrolito o el sustrato comprende la molécula bioactiva. Por ejemplo, el sustrato puede ser una plantilla que comprende moléculas bioactivas líquidas o cristalinas, tales como fármacos o proteínas. Alternativamente, el sustrato puede ser revestido con la molécula bioactiva. Por ejemplo, un núcleo inerte tal como una partícula de CaCO_3 puede ser revestido con la molécula bioactiva antes de la deposición de capas de polielectrolito. La partícula de CaCO_3 puede ser retirada después de la deposición de polielectrolito para formar una microcápsula hueca que comprende la molécula bioactiva.

En un caso, el precipitante polimérico tiene un efecto favorable sobre la deposición de polielectrolito al preparar la película, así como disminuye la solubilidad de una molécula bioactiva adsorbida, aumentando de este modo la cantidad de material encapsulado. Se puede usar un ensayo adecuado para medir la pérdida de las moléculas bioactivas de la plantilla al hacer una determinación empírica de la concentración apropiada de un precipitante polimérico dado. Por ejemplo, la molécula bioactiva puede ser etiquetada con un grupo fluorescente tal como fluoresceína o CY3, un compuesto de cianina fluorescente (Amersham BioSciences), o con un grupo con un espectro de absorbancia característico tal como tirosina. Se pueden realizar ensayos para determinar la fluorescencia o absorción retenida con la plantilla para evaluar la retención de la molécula bioactiva en presencia o ausencia de una concentración particular de un precipitante polimérico dado.

Se describe en la presente memoria una película preparada por este método. Es posible que algo de precipitante polimérico llegue a ser incorporado en la película en el procedimiento de fabricación. En algunos casos, tal incorporación podría ser deseable o útil.

Se discuten métodos para mejorar la retención de moléculas bioactivas durante la fabricación de una película multicapas de polielectrolito. El método puede comprender depositar una pluralidad de capas de polielectrolitos cargados opuestamente sobre un sustrato que comprende una molécula bioactiva, en donde la deposición de uno o más de los polielectrolitos cargados opuestamente se realiza en presencia de un precipitante polimérico. En un caso, uno o más de los polielectrolitos comprende un polipéptido. En otros casos, el método comprende adsorber una molécula bioactiva sobre un sustrato, y depositar una pluralidad de capas de polielectrolitos cargados opuestamente

sobre el sustrato revestido con la molécula bioactiva. La deposición de uno o más de los polielectrolitos cargados opuestamente y/o la adsorción de la molécula bioactiva se realiza en presencia de un precipitante polimérico. La cantidad de la molécula bioactiva retenida durante la deposición de una capa de un polielectrolito en presencia de un precipitante polimérico en relación con la cantidad retenida en ausencia del precipitante polimérico es mejorada hasta en al menos 15%, al menos 30%, al menos 50%, al menos 67%, al menos 100%, o al menos 200%.

Se describe en la presente memoria la deposición de los polielectrolitos cargados opuestamente por deposición LBL desde una disolución acuosa, al igual que se describe la deposición de los polielectrolitos cargados opuestamente sobre el sustrato por pulverización simultánea de disoluciones de los polielectrolitos cargados opuestamente. En algunos casos, un polielectrolito cargado opuestamente depositado sobre la plantilla comprende un motivo de secuencia de aminoácidos, en donde el motivo de secuencia de aminoácidos comprende n aminoácidos y el balance de cargas de la misma carga en el motivo de aminoácidos es mayor que o igual a $0,4 \cdot n$. En otras realizaciones, al menos uno de los polipéptidos cargados opuestamente comprende PLL o PLGA.

La molécula bioactiva es, por ejemplo, una proteína, un oligopéptido, un ácido nucleico, un oligonucleótido, un lípido, un carbohidrato, un producto farmacéutico, un agente microbiano, una estructura de membrana, una célula, un virus, un tejido, o una combinación de los mismos. La proteína puede ser una enzima, y la enzima puede ser glucosa oxidasa.

En algunos casos, la molécula bioactiva es depositada sobre una plantilla. Las plantillas adecuadas incluyen un sustrato orgánico y/o un sustrato inorgánico. La plantilla puede comprender un material que puede ser disuelto o desintegrado cambiando una propiedad química o física del sustrato o la disolución que contiene la plantilla. Por ejemplo, la plantilla puede comprender una micropartícula de CaCO_3 , que puede ser disuelta por mezcla con EDTA. En otros casos, la plantilla es una molécula bioactiva cristalina tal como una proteína o un fármaco.

Se describe una película de polipéptido que retiene una molécula bioactiva preparada por estos métodos.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1. Adsorción de glucosa oxidasa (GOx) sobre partículas de CaCO_3 y MF.

La proteína modelo fue GOx, elegida por sus útiles propiedades enzimáticas. Para los experimentos de adsorción de GOx, se mezclaron 5 mg de partículas de CaCO_3 (PlasmChem GmbH, Alemania) o partículas de melamina formaldehído (MF) con 100 μl de 37.300 unidades/g de GOx de Tipo II-S de *A. niger* (SIGMA, USA) en tampón Tris 10 mM, pH 7,4. La adsorción de GOx puede ser realizada a una temperatura donde la disolución de GOx permanezca en estado líquido, nominalmente aproximadamente 0 a aproximadamente 100°C para el agua pura a aproximadamente 101,3 kPa (1 atm) de presión, y la actividad enzimática de la GOx no sea inactivada irreversiblemente. La concentración final de partículas fue 5% (p/v). La adsorción de la enzima sobre las micropartículas fue cuantificada por la disminución en absorbancia de la fase líquida a 280 nm usando un espectrofotómetro Jasco V-430 (Japón). Las micropartículas cargadas con GOx fueron separadas de la disolución de adsorción del polipéptido por centrifugación. La adsorción de las partículas en función de la concentración de GOx y la concentración de sal en la disolución de alimentación se muestra en la Figura 2. La cantidad máxima de GOx cargada sobre las partículas de CaCO_3 fue aproximadamente 76 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de partículas, o aproximadamente $9,4 \times 10^{-12}$ gramos de enzima por partícula, suponiendo un volumen de partícula de $4,6 \times 10^{-11} \text{ cm}^3$. La Figura 2 muestra que la adsorción máxima a cada plantilla se consiguió en ausencia de sal monovalente añadida bajo estas condiciones de deposición.

Ejemplo 2. Encapsulación de una enzima en microcápsulas de polipéptido.

Se seleccionaron poli(L-lisina) (PLL) (PM de aproximadamente 14,6 kDa) y poli(ácido L-glutámico) (PLGA) (PM de aproximadamente 13,6 kDa) como polipéptido cargado opuestamente para la deposición de capas en este estudio piloto de encapsulación, porque están fácilmente disponibles en una fuente comercial. Una encapsulación que implicara polipéptidos diseñados en lugar de PLL y/o PLGA sería análoga. Se da un ejemplo de un par de péptidos cargados opuestamente que se han usado para este fin en Li y Haynie (2004) *Biomacromolecules* 5:1667-1670.

La GOx fue adsorbida a micropartículas de CaCO_3 añadiendo 0,10 ml de disolución de GOx 5 mg/ml a 5 mg de micropartículas de CaCO_3 , mezclando profusamente durante 2 horas y centrifugando durante 5 minutos a 1000 x g para la retirada de la fase fluida.

La deposición de cada multicapa de polipéptido sobre micropartículas de CaCO_3 con GOx adsorbida implicó un autoensamblaje durante 10 minutos bajo agitación suave a 4°C, seguido de centrifugación para separar las partículas de péptido no unido en la fase fluida. Se añadió un volumen de 0,1 ml de una disolución de 1 mg/ml de PLL (PM de aproximadamente 14,6 kDa) o bien de PLGA (PM de aproximadamente 13,6 kDa) en Tris 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,4 a las micropartículas a 4°C, y se mezcló profusamente. Se depositaron capas alternantes de PLL y PLGA sobre las micropartículas. Estuvo presente hasta 50% (v/v) de PEG 300 (Fluka) en las disoluciones de los polipéptidos; un PEG de masa molecular más alta tendía a dar una disolución excesivamente viscosa para el fin.

Después de la separación de la fase fluida de las partículas siguiendo cada etapa de adsorción de polipéptido, se analizaron los sobrenadantes de la disolución de ensamblaje en cuanto a absorbancia aromática. El PLL y PLGA no contienen residuos aromáticos, y por lo tanto no absorben a 280 nm; la GOx sí absorbe a esta longitud de onda. Se llevaron a cabo dos etapas de lavado intermedias con agua desionizada a 4°C entre ciclos de ensamblaje de polipéptidos. Este procedimiento se repitió hasta que se depositó el número deseado de capas (típicamente 6 bicapas). Después del ensamblaje de la capa final de polipéptido, las partículas revestidas fueron enjuagadas y recogidas por centrifugación. Después, los núcleos de las partículas fueron disueltos por tratamiento con EDTA 0,2 M, pH 7,4. El proceso de disolución tomó 10-20 minutos. Las microcápsulas fueron recogidas por centrifugación a 2000 x g durante 5 minutos, enjuagadas con agua desionizada, y resuspendidas en 0,25 ml de tampón Tris 10 mM. Se ensayaron alícuotas de muestra en cuanto a la actividad de la enzima como se describe más adelante. Se estimó que la concentración de muestra usada para experimentos adicionales era $1,5 \times 10^8$ cápsulas/ml. Se siguió el mismo procedimiento para los experimentos de fluorescencia confocal mostrados en la Figura 7, excepto que una GOx marcada con Cy3 reemplazó a la GOx.

La Figura 3 muestra la pérdida de GOx adsorbida de plantillas de CaCO_3 durante la deposición de una película encapsulante de PLL/PLGA en absorbancia a 280 nm debida a la GOx liberada presente en el lavado, el tampón de ensamblaje de PLL, y el tampón de ensamblaje de PLGA para ensamblaje en tampón en ausencia de un precipitante polimérico, para ensamblaje en tampón en presencia de PEG 300 al 40%, y para ensamblaje en tampón en presencia de PEG 300 al 50%. La magnitud de la absorbancia a 280 nm liberada durante la deposición de la primera capa de PLGA en presencia de PEG 300 al 40% o 50% es significativamente menor que la observada en ausencia de PEG 300. Se encontró que aumentar la concentración de PEG 300 de 10% hasta 50% en los tampones de deposición disminuye la desorción de la GOx de la plantilla durante el ensamblaje de la película.

Concentraciones de PEG 8000 comparables a las investigadas para el PEG 300 dieron viscosidades de disolución en las que el autoensamblaje de las capas de polipéptido no fue eficaz en el tiempo. Los pesos moleculares de PEG que son líquidos a temperatura ambiente, como lo es el PEG 300, son adecuados para el uso a 4°C como precipitante polimérico.

La Figura 4 muestra la retención de GOx sobre plantillas de CaCO_3 durante la deposición de la película encapsulante de PLL/PLGA. Los primeros puntos representan la "carga" de GOx inicial sobre las plantillas. Los puntos sucesivos muestran GOx remanente sobre las plantillas en etapas posteriores de ensamblaje de péptido y de enjuague de partículas. Sólo se muestran dos ciclos de deposición. Datos añadidos, complementarios, muestran la liberación de GOx de partículas plantilla cargadas con GOx, medida en el sobrenadante de disoluciones de lavado y ensamblaje.

Se usó un ensayo colorimétrico acoplado a enzimas que implicaba Amplex Red como sustrato para cuantificar la actividad de GOx. La Figura 5 muestra un esquema de reacción para el ensayo. La glucosa y el oxígeno se difunden dentro de la cápsula para uso mediante GOx para producir ácido glucurónico y H_2O_2 . El H_2O_2 se difunde fuera de la cápsula y es detectado, indirectamente, por Amplex Red. Inicialmente incoloro, este reactivo es oxidado por el H_2O_2 en presencia de peroxidasa de rábano picante (HRP) (250-330 unidades/mg de sólido), formando resorufina, que puede ser detectada por absorbancia a $\lambda = 563$ nm. Se prepararon las siguientes disoluciones madre: reactivo Amplex Red 10 mM (Molecular Probes, USA) en DMSO, 10 U/ml de GRP en tampón fosfato 50 mM y NaCl 0,15 M (PBS), glucosa 400 mM en PBS 50 mM, y 100 U/ml de GOx en PBS 50 mM. Se preparó una disolución de trabajo mezclando tres disoluciones: 30 μl de Amplex Red, 75 μl de HRP, y 450 μl de glucosa. Se prepararon disoluciones patrón de GOx, cada una de 500 μl y conteniendo 0 a 10 mU/ml, diluyendo la disolución madre de 100 U/ml de GOx. Muestras de cápsulas y muestras de control sin GOx se diluyeron cada una a 500 μl con tampón PBS 50 mM. Se inició una reacción añadiendo 40 μl de disolución de trabajo Amplex Red/HRP/glucosa a tubos que representaban patrones, controles y muestras de cápsula. Las mezclas de reacción fueron incubadas durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente con agitación suave. La absorbancia de la resorufina fue medida a 563 nm. La actividad enzimática medida fue convertida en cantidad de GOx activa calibrando la medida de la actividad en relación a la de una cantidad conocida de GOx.

La Figura 6 muestra la cantidad de GOx encapsulada activa en función del número de capas de polipéptido determinada usando el ensayo enzimático. Se muestra la cantidad de material retenido en la cápsula después de la disolución de la plantilla, con y sin adición de PEG en las disoluciones de ensamblaje de polipéptido. Las cápsulas de menos que 6 capas fueron inestables en disolución. Como se muestra en la Figura 6, cuando se llevó a cabo un ensamblaje de polipéptido en ausencia de PEG, la actividad de GOx asociada a micropartículas disminuyó notablemente con la deposición de PLL/PLGA hasta 2 bicapas. La actividad medida tendió a alcanzar un valor constante (p.ej., aproximadamente 11% del valor antes de la deposición del polipéptido) independiente del número de capas en el intervalo de 3-6 bicapas. La adición de PEG a las disoluciones de ensamblaje de PLL y PLGA mejoró sustancialmente la "carga" de "células artificiales" basadas en polipéptido con GOx. Aproximadamente 70% de actividad enzimática fue retenida en las células después de la deposición de 6 bicapas pero antes de la separación de fases. Una sonicación durante 20 min de células de 6 bicapas ensambladas usando PEG dio como resultado que no hubo ninguna disminución en la actividad enzimática. Esto sugiere que la encapsulación de GOx por una película multicapas de polipéptido ni inhibió la actividad enzimática ni impidió la difusión de moléculas pequeñas (p.ej. glucosa (sustrato de la enzima) y productos de reacción) a través de la barrera. El grado de migración de GOx en la célula artificial no fue determinado.

La confirmación de que la actividad enzimática medida estaba de hecho asociada con las células artificiales se obtuvo como sigue. La actividad de GOx en disolución fue cuantificada después de la separación de las células de 6 bicapas de la fase fluida usando un filtro de 0,22 µm. No se detectó actividad de GOx en el filtrado en ausencia de PEG; la actividad enzimática estuvo en las células artificiales. Se detectó algo de enzima (aproximadamente $1,5 \times 10^{-12}$ g/cápsula) en el filtrado cuando se usó el protocolo PEG. Presumiblemente, esto fue debido al colapso parcial de las plantillas/células revestidas durante la centrifugación y lavado repetidos. No se detectó más actividad en el filtrado después de la resuspensión de las células, indicando que la GOx cargada no se lixivió. Se usó el mismo planteamiento para cuantificar la retención de GOx en las células.

Se marcó la GOx con un colorante fluorescente, éster de NHS monorreactivo de Cy3 (Amersham BioSciences, UK) para visualizar microcápsulas cargadas con GOx. La encapsulación de Cy3-GOx dentro de una película de PLL/PLGA siguió a la adsorción sobre micropartículas de CaCO₃. El estudio de la influencia del número de capas sobre la estabilidad de las células artificiales por microscopía de fluorescencia reveló que los revestimientos con menos que 3 bicapas tendían a disociarse después de la disolución de la partícula núcleo, mientras que las cápsulas con 3 o más bicapas usualmente fueron estables en disolución acuosa en una escala de tiempo de semanas. Esto es consistente con las medidas de actividad de GOx reportadas aquí. El grosor de la película está directamente relacionado con el número de capas. Se obtuvieron más evidencias de la carga de GOx marcada con Cy3 en microcápsulas de PLL/PLGA de 6 bicapas por microscopía de fluorescencia láser confocal (Figura 7a, panel izquierdo). El panel derecho, obtenido por iluminación de campo brillante, muestra que las plantillas de micropartículas se disolvieron completamente por el tratamiento con EDTA. Los perfiles de sección transversal de intensidad de fluorescencia de una cápsula de 6 bicapas revelaron que el interior de la microcápsula estaba lleno de una cantidad sustancial de GOx marcada con Cy3 no unida (Figura 7b, izquierda). El diámetro de la célula fue aproximadamente el de la plantilla original (Figura 7b, derecha). La aparición de dos picos en el perfil de intensidad indica que algo de GOx estaba unida a las "membranas" de las células, probablemente debido a atracción electrostática y disipación. Se obtuvieron más evidencias de la encapsulación de GOx en células de polipéptido por espectroscopía de dicroísmo circular (datos no mostrados).

Ejemplo 3. Encapsulación de una enzima en una microcápsula de polielectrolito.

En otro ejemplo, se carga la proteína hemoglobina sobre partículas de carbonato de calcio en suero salino tamponado con fosfato (pH 7,4) y se encapsula con polielectrolitos no peptídicos. La eficacia de carga de proteína es aumentada mediante la adición de un precipitante polimérico a la disolución de proteína, por ejemplo, PEG 300 al 40%. La proteína adsorbida es encapsulada por LBL con dos polielectrolitos cargados opuestamente. Los polímeros adecuados para el fin son poli(sulfonato de estireno), un polianión, y poli(alilamina), un policación. La prueba de carga de proteína se puede obtener por espectrofotometría en el intervalo visible: la hemoglobina tiene una gran banda de absorción cerca de 410 nm, debido a la presencia de hemo.

Esta invención presenta un medio para la retención de alta eficacia de moléculas bioactivas funcionales en películas y microcápsulas de polielectrolito producidas por nanoingeniería por inclusión de un precipitante polimérico en los tampones de ensamblaje. La película multicapas de polielectrolito fue semipermeable, impidiendo la fuga del compuesto biológico modelo sin excluir la permeabilidad de moléculas pequeñas. La biocompatibilidad inherente de los polipéptidos encapsulantes presenta ventajas para aplicaciones biomédicas sobre polielectrolitos sintéticos no biodegradables más comúnmente usados al formar películas finas por LBL.

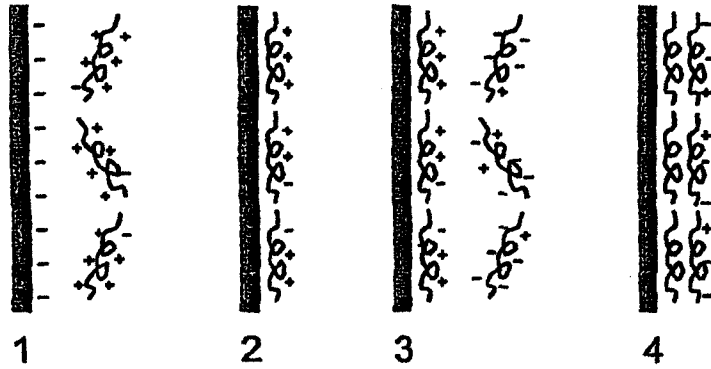
El uso de "un" y "el" y referentes similares (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) es para ser interpretado que cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o sea contradicho claramente por el contexto. Los términos primero, segundo, etc., como se emplean en la presente memoria, no pretenden denotar ninguna ordenación particular, sino simplemente por conveniencia para denotar una pluralidad de, por ejemplo, capas. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye", y "que contiene" son para ser interpretados como términos de extremo abierto (es decir, que significan "que incluye, pero no se limita a") a menos que se indique lo contrario. La recitación de intervalos de valores pretende meramente servir como un método abreviado de hacer referencia individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en la presente memoria, y cada valor separado es incorporado en la memoria descriptiva como si fuera recitado individualmente en la presente memoria. Los puntos finales de todos los intervalos están incluidos dentro del intervalo, y son combinables independientemente. Todos los métodos descritos en la presente memoria se pueden realizar en un orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o sea contradicho claramente de otro modo por el contexto. El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o de lenguaje ilustrativo (p.ej., "tal como"), pretende meramente ilustrar mejor la invención, y no impone una limitación sobre el alcance de la invención, a menos que se reivindique lo contrario. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse como que indica algún elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención como se emplea en la presente memoria.

REIVINDICACIONES

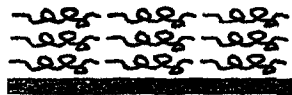
1. Un método para preparar una película, comprendiendo el método bien:
 - a) depositar un polielectrolito de primera capa sobre una superficie de un sustrato para formar una primera capa; y depositar un polielectrolito de segunda capa sobre el polielectrolito de primera capa para formar una segunda capa;
- 5 en donde (i) el polielectrolito de primera capa, el polielectrolito de segunda capa, o ambos, se deposita sobre el sustrato en presencia de un precipitante polimérico;
 - (ii) el polielectrolito de primera capa y el polielectrolito de segunda capa tienen cargas netas de polaridad opuesta; y
 - (iii) el polipéptido de primera capa, el polipéptido de segunda capa, o ambos, se deposita en presencia de una molécula bioactiva y/o el sustrato comprende una molécula bioactiva;
- 10 o bien
 - b) depositar una molécula bioactiva sobre la superficie de un sustrato en presencia de un precipitante polimérico;
- depositar un polielectrolito de primera capa sobre una superficie del sustrato para formar una primera capa; y depositar un polielectrolito de segunda capa sobre el polielectrolito de primera capa para formar una segunda capa;
- 15 en donde el polielectrolito de primera capa y el polielectrolito de segunda capa tienen cargas netas de polaridad opuesta.
2. El método de la reivindicación 1a, en donde la molécula bioactiva está en la forma de un revestimiento sobre el sustrato, o está en la forma de un núcleo.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el sustrato comprende una plantilla adecuada para desintegración después de la deposición de la película multicapas de polielectrolito.
- 20 4. El método de la reivindicación 1a, en donde el polielectrolito de la primera capa, el polielectrolito de la segunda capa, o ambos, comprende un polipéptido diseñado, en donde el polipéptido diseñado comprende uno o más primeros motivos de secuencia de aminoácidos, en donde el uno o más motivos de secuencia de aminoácidos consiste en 5 a 15 residuos de aminoácidos y tiene una magnitud de carga neta por residuo mayor que o igual a 0,4, y
- 25 en donde el polipéptido diseñado no es un homopolipéptido, es al menos de 15 residuos de aminoácidos de largo, y tiene una magnitud de carga neta por residuo mayor que o igual a 0,4.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1a o 2 a 4, que comprende además depositar una molécula bioactiva sobre la superficie del sustrato antes de depositar el polielectrolito de primera capa.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1a o 2 a 5, en donde el precipitante polimérico comprende polietilenglicol, poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpirrolidona), poli(propilenglicol), o una combinación de uno o más de los precipitantes poliméricos anteriores.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1a o 2 a 6, en donde la película está en la forma de una microcápsula.
8. El método de la reivindicación 7, en donde una molécula bioactiva es encapsulada por la microcápsula.
- 35 9. El método de la reivindicación 1b, en donde la primera capa de polielectrolito, la segunda capa de polielectrolito, o ambas, es depositada sobre el sustrato en presencia de un precipitante polimérico.

Figura 1

Autoensamblaje capa
a capa (LBL) de películas
multicapas



Película formada
sobre un
sustrato plano
(revestimiento)



Película formada
sobre una plantilla
esférica (cápsula)

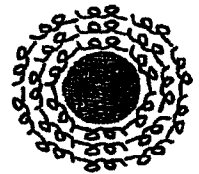


Figura 2

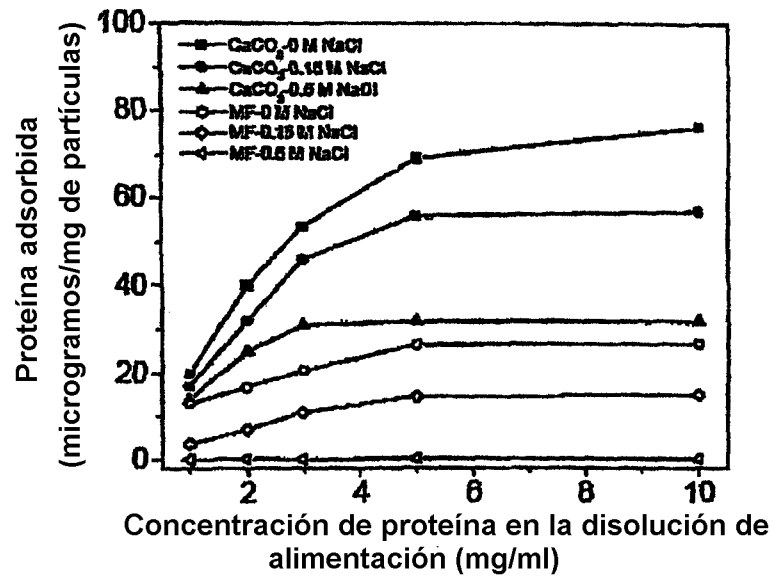


Figura 3

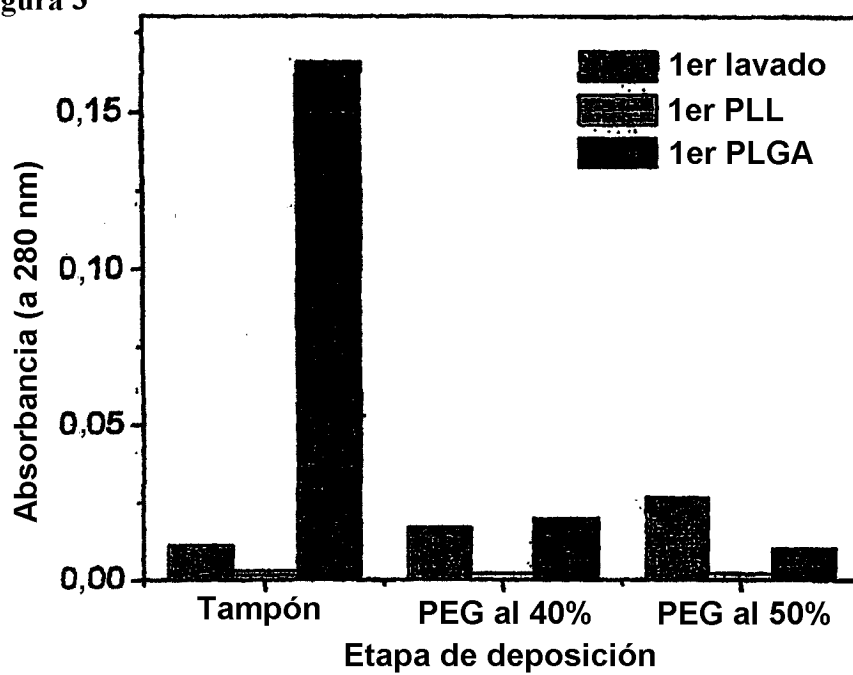


Figura 4

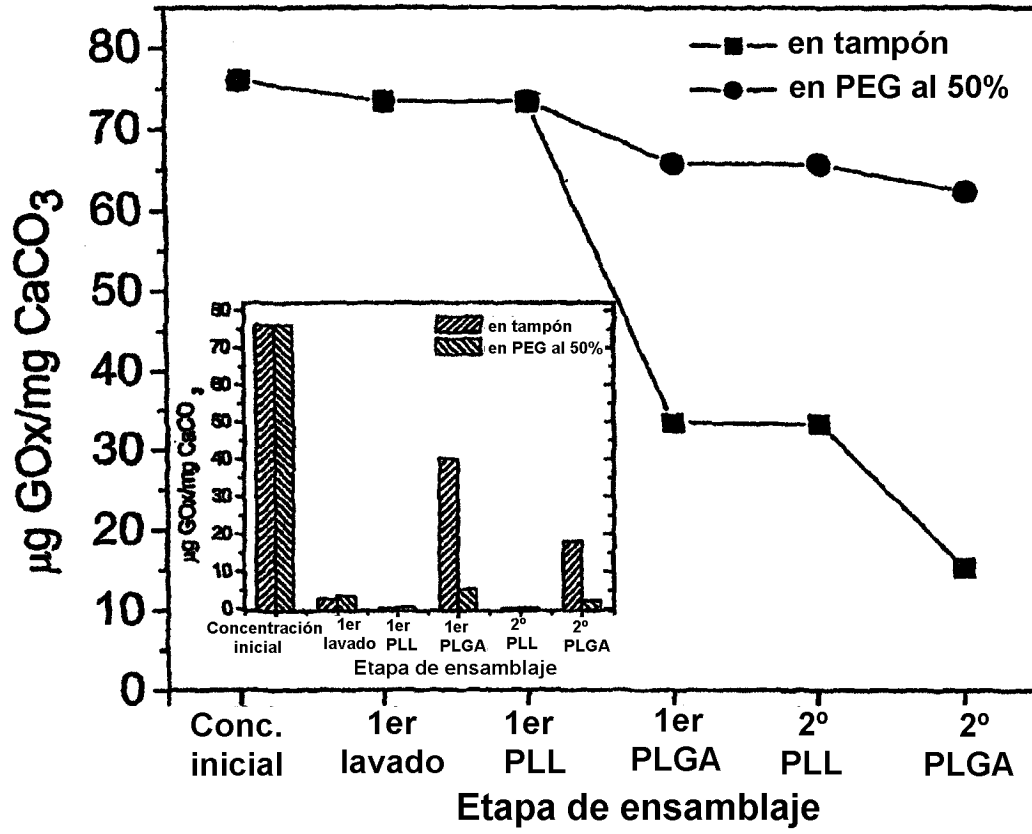


Figura 5

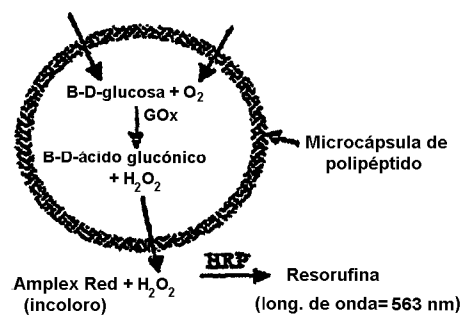


Figura 6

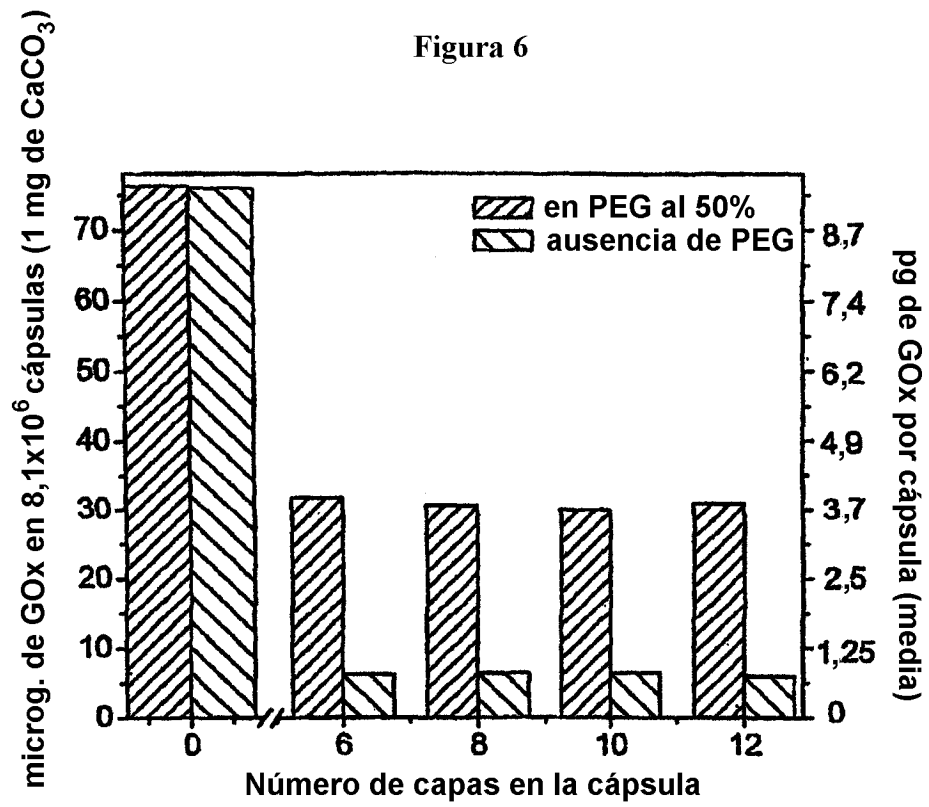


Figura 7

