

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 692**

51 Int. Cl.:

**A61K 49/00** (2006.01)

**A61K 47/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.07.2001 PCT/US2001/23072**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.01.2017 WO2002007773**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2001 E 01963739 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 1301213**

54 Título: **Sistemas de transporte de agentes biológicos de múltiples componentes**

30 Prioridad:

**21.07.2000 US 220244 P**

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

**19.06.2017**

73 Titular/es:

**REVANCE THERAPEUTICS, INC. (100.0%)  
7555 Gateway Blvd.  
Newark, CA 94560, US**

72 Inventor/es:

**WAUGH, JACOB M. y  
DAKE, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 617 692 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

Sistemas de transporte de agentes biológicos de múltiples componentes

5 **Antecedentes de la invención**

Los sistemas de liberación de genes pueden clasificarse, de forma general, en dos grupos: virales y no virales. Los sistemas virales tienen riesgos de toxicidad importantes y han ocasionado serias complicaciones y muertes en ensayos clínicos. Los sistemas no virales son bastante menos eficaces que los enfoques virales, pero ofrecen la posibilidad de adaptar aplicaciones para aumentar la especificidad y posiblemente reducir la toxicidad. Las estrategias no virales pueden clasificarse, en general, como estrategias basadas en lípidos o estrategias no basadas en lípidos. La estrategia presentada en esta invención puede aplicarse a cualquiera de los enfoques no virales existentes, y todo ello se describirá en el presente documento.

El sistema no viral más sencillo es la liberación directa de ADN. Debido a la carga negativa del ADN, realmente entra muy poco del ADN en la célula y la mayor parte se degrada. Prácticamente nada del ADN entra en el núcleo sin una secuencia de dirección nuclear en la estrategia. Convencionalmente, se emplea otro factor para aumentar la eficacia de la liberación del gen/producto (ADN, ARN o, más recientemente, agentes terapéuticos proteicos) por efectos mecánicos tales como electroporación, ultrasonidos, "pistolas génicas" y microinyección directa, o por neutralización de carga y efectos químicos con agentes tales como fosfato cálcico, polilisina y preparaciones de liposomas. En estas últimas estrategias, se ha demostrado que la neutralización de carga aumenta las eficacias no específicas varias veces con respecto incluso a los efectos químicos/mecánicos de las preparaciones de liposomas solas. Basándose en estos resultados y en otros resultados similares, muchos autores han concluido que el ADN y el ARN requieren neutralización de carga para conseguir eficacia en la captación celular, ya que la carga negativa del ADN básicamente obstaculiza el transporte excepto cuando se usa endolisis con la posterior fusión de lisosomas (se evita mediante la adición de otros agentes). La mayoría de los agentes de transfección en realidad usan un exceso de carga positiva en relaciones de 2-4 veces la carga negativa neta del ADN. El híbrido positivo resultante se une iónicamente a proteoglicanos de la superficie celular cargados negativamente y aumenta de forma espectacular la captación posterior. Algunos agentes de transfección parecen tener un tropismo celular, muy probablemente debido a patrones estéricos y de carga que se dirigen de forma más eficaz a proteoglicanos particulares, que varían en los patrones específicos de tipo celular. Incluso con los agentes apropiados (es decir, el tropismo correcto), la neutralización de carga sola o en combinación con liposomas sigue siendo extremadamente ineficaz con respecto a las estrategias virales. De esta manera, la comunidad ha identificado varios péptidos y fragmentos peptídicos que facilitan la entrada eficaz de un complejo en una célula y superar cualquier etapa en la que estén implicados los endolisosomas. Varios de estos factores de transporte incluso permiten una entrada eficaz en el núcleo. En un proceso, el factor de transporte está asociado directamente al producto terapéutico de interés (fármaco pequeño, gen, proteína, etc.). Este enfoque requiere que se produzca, se purifique y se ensaye un nuevo fármaco unido al factor de transporte. En muchos casos, estos híbridos realmente constituirán nuevos fármacos y requerirán un ensayo completo. Este proceso tiene como resultado un riesgo y gasto adicional significativo. Como alternativa, varias estrategias simplemente emplean la mezcla del agente de forma no específica (o incluso de forma específica en la superficie) en preparaciones de liposomas como vehículos para un fármaco/ADN/factor. Aunque suponen una mejora con respecto a las modalidades directas o más sencillas en términos de eficacia, estos enfoques siguen siendo ineficaces (en comparación con los virus) y considerablemente más tóxicos que las estrategias no virales sencillas. Parte de esta ineficacia se debe a la mala traslocación nuclear. Como resultado, se han desarrollado estrategias para añadir señales de traslocación nuclear al complejo detallado anteriormente, como parte del híbrido del factor terapéutico o como parte de la mezcla de liposomas. Otros perfeccionamientos han incluido intentos de reducir la degradación del ADN/ARN/factor.

Quizás los perfeccionamientos más importantes en las estrategias básicas presentadas anteriormente han incluido ligandos específicos u otros agentes de dirección junto con el factor terapéutico. Estas estrategias ofrecen la posibilidad de reducir en gran medida la toxicidad no específica y mejorar de forma sustancial la eficacia, particularmente cuando se combinan con agentes de eficacia descritos anteriormente. Sin embargo, las estrategias actuales se basan en enlaces covalentes con un solo vehículo y, por lo tanto, necesitan una síntesis específica (para asegurar que las consideraciones estéricas en un grado de esquema de sustitución no favorecen un solo factor con respecto a los otros, es decir, para asegurar que cada factor de eficacia y cada resto de formación de imágenes, y cada resto de dirección está presente en la cadena principal). Esto hace que sea prácticamente imposible realizar varias construcciones específicas (por ejemplo, sialil-lewis X y un fragmento Fab contra un antígeno de superficie, ya que las limitaciones estéricas impedirían la unión eficaz del uno o del otro en la mayoría de los esquemas y, a su vez, interferirían con los factores de eficacia. Aunque son prometedores en concepto, estos enfoques representan soluciones caras, con un rendimiento muy bajo (en términos de síntesis) y no demostradas para este problema.

Como será evidente, con cada etapa del desarrollo en la liberación de factores y genes usando sistemas no virales han surgido problemas que se han solucionado en la etapa siguiente con un grado de complejidad añadido. Cada mejora representaba un paso incremental con respecto al patrón previo. Sin embargo, la complejidad añadida lleva riesgos asociados desde el punto de vista del cuidado del paciente, e ineficacia y aumento del coste desde el punto de vista de la producción. Estos inconvenientes han hecho que se haya reducido en gran medida el entusiasmo por

estas posibles terapias que, por lo demás, eran prometedoras.

El documento WO 96/11712 desvela una composición para la liberación de genes que comprende múltiples moléculas poliméricas que tienen una carga neta positiva o una carga neta negativa y que tienen unidos a las mismas, por ejemplo, restos de dirección a las células. El documento WO 00/32764 desvela oligolisinas histidiladas y su uso para la liberación dirigida de genes. También se han usado péptidos básicos derivados del dominio de transducción de proteínas de TAT de VIH para la liberación dirigida de genes (Schwartz et al., Current Opinion in Molecular Therapeutics, 2000, 2: 162-167).

Lo que se necesitan son nuevos métodos y composiciones que se puedan aplicar de forma general a composiciones de diversos agentes terapéuticos o cosmecéuticos, que puedan dirigirse o de los que se puedan obtener imágenes para maximizar la liberación en un sitio particular. Sorprendentemente, la presente invención proporciona dichas composiciones y métodos.

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas 1-28.

### Sumario de la invención

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende un complejo de asociación no covalente de:

- a) una cadena principal cargada positivamente; y
- b) al menos dos miembros seleccionados de entre:

- i) una primera cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de restos de formación de imágenes unidos;
- ii) una segunda cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes de dirección unidos;
- iii) al menos un miembro seleccionado entre ARN, ADN, ribozimas, oligonucleótidos modificados y ADNc que codifica un transgén seleccionado;
- iv) ADN que codifica al menos un factor de persistencia; y
- v) una tercera cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes biológicos unidos;

en la que el complejo de asociación lleva una carga positiva neta y al menos uno de los dos miembros del grupo b) se selecciona de los grupos i), iii) o v).

Los agentes biológicos pueden ser un agente terapéutico o un agente cosmecéutico. Como alternativa, pueden usarse agentes candidatos para determinar la eficacia *in vivo* en estos complejos de asociación no covalente.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende un complejo de asociación no covalente de una cadena principal cargada positivamente que tiene al menos un grupo de eficacia unido y al menos un miembro de ácido nucleico seleccionado el grupo que consiste en ARN, ADN, ribozimas, oligonucleótidos modificados y ADNc que codifica un transgén seleccionado.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para liberar un agente biológico en una superficie celular en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una composición como se ha descrito anteriormente.

En otro aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para preparar una composición farmacéutica o cosmecéutica, comprendiendo el método combinar un componente de cadena principal cargado positivamente y al menos dos miembros seleccionados de entre:

- i) una cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de restos de formación de imágenes unidos;
  - ii) una cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes de dirección unidos;
  - iii) al menos un miembro seleccionado entre ARN, ADN, ribozimas, oligonucleótidos modificados y ADNc que codifica un transgén seleccionado;
  - iv) ADN que codifica al menos un factor de persistencia; y
  - v) una cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes terapéuticos o cosmecéuticos unidos;
- con un vehículo farmacéutica o cosmecéuticamente aceptable para formar un complejo de asociación no covalente que tiene una carga neta positiva, con la condición de que al menos uno de dichos dos miembros de los grupos i) a v) se seleccione de entre los grupos i), iii) o v).

En otro aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un kit para formular una composición de liberación

farmacéutica o cosmeceútica, comprendiendo el kit un componente de cadena principal cargado positivamente y al menos dos componentes seleccionados de entre los grupos i) a v) indicados anteriormente, junto con instrucciones para preparar la composición de liberación.

## 5 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona una representación esquemática de los componentes usados en la invención.

La Figura 2 proporciona una representación esquemática de varias realizaciones de la invención.

10 Las Figuras 3-10 proporcionan fotografías que representan la liberación transdérmica de una formulación terapéutica como se describe en el Ejemplo 4.

Las Figuras 11-12 proporcionan fotografías que representan la dirección de una formulación terapéutica como se describe en el Ejemplo 5.

## 15 Descripción de la invención

### General

La presente invención proporciona un sistema basado en componentes para la liberación selectiva y persistente de agentes de formación de imágenes o agentes terapéuticos. Las características individuales para las composiciones pueden seleccionarse diseñando componentes deseados en las formulaciones que reciben los pacientes. Además, se proporcionan restos de formación de imágenes y de dirección específica en cadenas principales cargadas negativamente separadas que formarán una asociación iónica no covalente con una cadena principal positiva. Al poner estos componentes en una cadena principal cargada negativamente, la invención evita la necesidad de unir componentes en localizaciones precisas en una cadena principal positiva como la empleada en otras estrategias (aumentando la complejidad y el coste y reduciendo la eficacia a un nivel tal que aún no se ha presentado una combinación satisfactoria debido a las limitaciones estéricas). Se proporciona una comprensión adicional de la invención haciendo referencia a la Figura 1. En esta figura, los componentes se muestran como (1) una cadena principal continua que tiene unidos grupos cargados positivamente (también denominados grupos de eficacia que se representan como círculos negros unidos a una barra oscura, por ejemplo  $(\text{Gly})_{n1}-(\text{Arg})_{n2}$  (donde el subíndice  $n1$  es un número entero de 3 a aproximadamente 5, y el subíndice  $n2$  es un número entero impar de aproximadamente 7 a aproximadamente 17) o dominios TAT; (2) una cadena principal corta cargada negativamente que tiene unidos restos de formación de imágenes (triángulos blancos unidos a una barra clara); (3) una cadena principal corta cargada negativamente que tiene unidos agentes de dirección y/o agentes terapéuticos (círculos blancos unidos a una barra clara); (4) un oligonucleótido, ARN, ADN o ADNc (barra sombreada clara); y (5) ADN que codifica factores de persistencia (barra sombreada oscura). La Figura 2 ilustra varios ejemplos de composiciones de múltiples componentes en las que los grupos se representan como se indica en la Figura 1. Por ejemplo, en la Figura 2, se ilustra una primera composición de múltiples componentes en la que una cadena principal cargada positivamente tiene asociado un componente de formación de imágenes, un componente de dirección, un oligonucleótido y un factor de persistencia. Se ilustra una segunda composición de múltiples componentes que está diseñada para la formación de imágenes de diagnóstico/pronóstico. En esta composición, la cadena principal cargada positivamente está complejada tanto con componentes de formación de imágenes como con componentes de dirección. Finalmente, se ilustra un tercer sistema de múltiples componentes que es útil para la liberación de genes. En este sistema, se forma un complejo de asociación entre una cadena principal cargada positivamente, un componente de dirección, un gen de interés y un ADN que codifica un factor de persistencia. La presente divulgación descrita con más detalle más adelante proporciona varias composiciones adicionales útiles en programas terapéuticos y de diagnóstico.

## Descripción de las realizaciones

### 50 Composiciones

En vista de lo anterior, la presente divulgación proporciona, en un aspecto, una composición que comprende un complejo de asociación no covalente de:

- 55 a) una cadena principal cargada positivamente; y  
b) al menos dos miembros seleccionados de entre:
- 60 i) una primera cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de restos de formación de imágenes unidos;  
ii) una segunda cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes de dirección unidos;  
iii) al menos un miembro seleccionado de entre ARN, ADN, ribozimas, oligonucleótidos modificados y ADNc que codifica un transgén seleccionado;  
iv) ADN que codifica al menos un factor de persistencia; y  
65 v) una tercera cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes biológicos unidos;

en la que el complejo de asociación lleva una carga neta positiva y al menos uno de los dos miembros del grupo b) se selecciona entre los grupos i), iii) o v).

- 5 En un grupo de realizaciones, la composición comprende al menos tres miembros seleccionados de entre los grupos i) a v). En otro grupo de realizaciones, la composición comprende al menos un miembro de cada uno de los grupos i), ii), iii) y iv). En otro grupo más de realizaciones, la composición comprende al menos un miembro de cada uno de los grupos i) y ii). Y en otro grupo de realizaciones, la composición comprende al menos un miembro de cada uno de los grupos ii), iii) y iv).
- 10 Preferentemente, la cadena principal cargada positivamente tiene una longitud de aproximadamente 1 a 4 veces las longitudes combinadas de los miembros del grupo b). Como alternativa, la cadena principal cargada positivamente tiene una relación de carga de aproximadamente 1 a 4 veces la carga combinada de los miembros del grupo b). En algunas realizaciones, la densidad de carga es uniforme y las relaciones de longitud y carga son aproximadamente iguales. Las relaciones de tamaño a tamaño (longitud) pueden determinarse basándose en estudios moleculares de los componentes o pueden determinarse a partir de las masas de los componentes.

#### Cadena principal cargada positivamente

20 La cadena principal cargada positivamente típicamente es una cadena lineal de átomos, llevando ciertos grupos presentes en la cadena una carga positiva a pH fisiológico, o llevando ciertos grupos una carga positiva unida a cadenas laterales que se extienden desde la cadena principal. La cadena principal lineal es una cadena principal de hidrocarburo que, en algunas realizaciones, está interrumpida por heteroátomos seleccionados de entre nitrógeno, oxígeno, azufre, silicio y fósforo. La mayor parte de los átomos de la cadena principal normalmente son carbonos. Además, la cadena principal con frecuencia será un polímero de unidades repetidas (por ejemplo, aminoácidos, poli(óxido de etileno), poli(propilenoamina) y similares).

25 En un grupo de realizaciones, la cadena principal cargada positivamente es una polipropilenoamina en la que varios de los átomos de nitrógeno de amina están presentes en forma de grupos amonio (tetra-sustituídos) que llevan una carga positiva. En otro grupo de realizaciones, la cadena principal tiene unida una pluralidad de restos de cadena lateral que incluyen grupos cargados positivamente (por ejemplo, grupos amonio, grupo piridinio, grupos fosfonio, grupos sulfonio, grupos guanidinio o grupos amidinio). Los restos de cadena lateral de este grupo de realizaciones pueden estar situados en localizaciones separadas a lo largo de la cadena principal de forma uniforme o variable. Además, la longitud de las cadenas laterales puede ser similar o diferente. Por ejemplo, en un grupo de realizaciones, las cadenas laterales pueden ser cadenas de hidrocarburo lineales o ramificadas que tienen de uno a veinte átomos de carbono y que terminan en el extremo distal (alejado de la cadena principal) en uno de los grupos cargados positivamente indicados anteriormente.

35 En un grupo de realizaciones, la cadena principal cargada positivamente es un polipéptido que tiene múltiples grupos de cadena lateral cargados positivamente (por ejemplo, lisina, arginina, ornitina, homoarginina y similares). Un experto en la materia apreciará que cuando se usan aminoácidos en esta parte de la invención, las cadenas laterales pueden tener la forma D o L (configuración R o S) en el centro de la unión.

40 Como alternativa, la cadena principal puede ser un análogo de un polipéptido tal como un peptoide. Véase, por ejemplo, Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32: 543 (1993); Zuckermann et al. *Chemtracts-Macromol. Chem.* 4: 80 (1992); y Simon et al. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89: 9367 (1992)). En resumen, un peptoide es una poliglicina en la que en la cadena lateral está unida a los átomos de nitrógeno de la cadena principal en lugar de a los átomos de carbono  $\alpha$ . Como se ha indicado anteriormente, una parte de las cadenas laterales típicamente terminará en un grupo cargado positivamente para proporcionar un componente de cadena principal cargada positivamente. Se describe la síntesis de peptoides, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 5.877.278. Como se usa el término en el presente documento, las cadenas principales cargadas positivamente que tienen una construcción de cadena principal de peptoide se consideran "no péptidos", ya que no están compuestas de aminoácidos que tienen cadenas laterales naturales en las localizaciones de carbono  $\alpha$ .

55 Puede usarse una diversidad de cadenas principales distintas empleando, por ejemplo, miméticos estéricos o electrónicos de polipéptidos en los que los enlaces amida del péptido se han reemplazado por sustitutos tales como enlaces éster, tioamidas (-CSNH-), tioamida inversa (-NHCS-), aminometileno (-NHCH<sub>2</sub>-) o grupos metilenoamino inverso (-CH<sub>2</sub>NH-), grupos cetometileno (-COCH<sub>2</sub>-), fosfinato (-PO<sub>2</sub>RCH<sub>2</sub>-), fosfonamido y éster de fosfonamido (-PO<sub>2</sub>RNH-), péptido inverso (-NHCO-), trans-alqueno (-CR=CH-), fluoroalqueno (-CF=CH-), dimetileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), tioéter (-CH<sub>2</sub>S-), hidroxietileno (-CH(OH)CH<sub>2</sub>-), metilenoxi (-CH<sub>2</sub>O-), tetrazol (CN<sub>4</sub>), sulfonamido (-SO<sub>2</sub>NH-), metileno sulfonamido (-CHRSO<sub>2</sub>NH-), sulfonamida inversa (-NHRSO<sub>2</sub>-), y cadenas principales con subunidades malonato y/o gem-diaminoalquilo, por ejemplo, como se revisa por Fletcher et al. ((1998) *Chem. Rev.* 98: 763) y se detalla por referencias citadas en el presente documento. Muchas de las sustituciones anteriores dan como resultado cadenas principales poliméricas aproximadamente isostéricas con respecto a las cadenas principales formadas a partir de  $\alpha$ -aminoácidos.

65 En cada una de las cadenas principales proporcionadas anteriormente, pueden colgarse grupos de cadena lateral que llevan un grupo cargado positivamente. Por ejemplo, las cadenas principales unidas a sulfonamida (-SO<sub>2</sub>NH- y -NHSO<sub>2</sub>-) pueden tener grupos de cadena lateral unidos a los átomos de nitrógeno. De manera similar, el enlace de

hidroxietileno (-CH(OH)CH<sub>2</sub>-) puede llevar un grupo de cadena lateral unido al sustituyente hidroxilo. Un experto en la materia puede adaptar fácilmente las otras químicas de enlace para proporcionar grupos de cadena lateral cargados positivamente usando métodos de síntesis convencionales.

5 En una realización particularmente preferida, la cadena principal cargada positivamente es un polipéptido que tiene grupos de ramificación (también denominados grupos de eficacia) que comprenden - (gly)<sub>n1</sub>-(arg)<sub>n2</sub> (SEQ ID NO: 8-18), TAT de VIH en el que el subíndice n1 es un número entero de 0 a 20, más preferentemente de 0 a 8, aún más preferentemente de 2 a 5, y el subíndice n2 es un número entero impar de aproximadamente 5 a aproximadamente 25, más preferentemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 17, más preferentemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 13. También se prefieren las realizaciones en las que el fragmento TAT de VIH tiene la fórmula (gly)<sub>p</sub>-RGRDDRRQRRR-(gly)<sub>q</sub> (SEQ ID NO: 19) o (gly)<sub>p</sub>-YGRKKRRQRRR-(gly)<sub>q</sub> (SEQ ID NO: 20) en la que los subíndices p y q son cada uno, independientemente, un número entero de 0 a 20 y el fragmento está unido a la cadena principal a través del extremo C o el extremo N del fragmento. Son fragmentos TAT de VIH preferidos aquellos en los que los subíndices p y q son cada uno, independientemente, números enteros del 0 a 8, más preferentemente de 2 a 5.

En otra realización particularmente preferida, la parte de la cadena principal es una polilisina y los grupos de ramificación cargados positivamente están unidos a los grupos amino de la cadena lateral de lisina. La polilisina usada en esta realización particularmente preferida puede ser cualquiera de las polilisinias disponibles en el mercado (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA) tales como, por ejemplo, polilisina que tiene PM > 70.000, polilisina que tiene PM de 70.000 a 150.000, polilisina que tiene PM de 150.000 a 300.000 y polilisina que tiene PM > 300.000. La selección apropiada de una polilisina dependerá de los demás componentes de la composición y será suficiente para proporcionar una carga neta positiva global a la composición y proporcionar una longitud que preferentemente sea de una a cuatro veces la longitud combinada de los componentes cargados negativamente. Los grupos de ramificación cargados positivamente o grupos de eficacia preferidos incluyen, por ejemplo, -gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg (-Gly<sub>3</sub>Arg<sub>7</sub>) (SEQ ID NO: 1) o TAT de VIH.

#### Otros componentes

30 Además del componente de cadena principal cargada positivamente, las composiciones de la presente invención comprenden al menos dos componentes de los siguientes:

- i) una cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de restos de formación de imágenes unidos;
- 35 ii) una cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de restos de dirección unidos;
- iii) una cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes biológicos unidos; en las que cada uno de dichos agentes biológicos es un agente terapéutico o cosmético seleccionado del grupo que consiste en toxina botulínica, EGF, TGF-beta 1, insulina, VEGF, un bloqueante de VEGF y anticuerpos contra VEGF.

40 Las cadenas principales cargadas negativamente usadas para llevar los restos de formación de imágenes, restos de dirección y agentes terapéuticos pueden ser una diversidad de cadenas principales (similares a las descritas anteriormente) que tienen múltiples grupos que llevan una carga negativa a pH fisiológico. Son grupos cargados negativamente adecuados ácidos carboxílicos, ácidos fosfínico, fosfónico o fosfórico, ácidos sulfínico o sulfónico y similares. En algunas realizaciones, la cadena principal cargada negativamente será un ácido oligonucleico. En otras realizaciones, la cadena principal cargada negativamente es un oligosacárido (por ejemplo, dextrano). En otras realizaciones, la cadena principal cargada negativamente es un polipéptido (por ejemplo, poli(ácido glutámico), poli(ácido aspártico) o un polipéptido en el que los restos de ácido glutámico o ácido aspártico están interrumpidos por aminoácidos no cargados). Los restos descritos con más detalle más adelante (restos de formación de imágenes, agentes de dirección y agentes terapéuticos) pueden unirse a una cadena principal que tiene estos grupos colgantes, típicamente a través de enlaces éster. Como alternativa, pueden usarse aminoácidos que interrumpen los aminoácidos cargados negativamente o están colgando del extremo de la cadena principal cargada negativamente, para unir restos de formación de imágenes y restos de dirección mediante, por ejemplo, enlaces disulfuro (a través de un resto de cisteína), enlaces amida, enlaces éter (a través de grupos hidroxilo de serina o treonina) y similares.

#### *Restos de formación de imágenes*

60 En la presente invención son útiles una diversidad de restos de diagnóstico o de formación de imágenes y están presentes en una cantidad eficaz que dependerá de la afección a diagnosticar o de la que se deseen obtener imágenes, la vía de administración, la sensibilidad del agente y el dispositivo usado para la detección del agente, y similares.

65 Los ejemplos de agentes de formación de imágenes o de diagnóstico adecuados incluyen agentes de contraste radiopacos, agentes de contraste paramagnéticos, agentes de contraste superparamagnéticos, agentes de contraste CT y otros agentes de contraste. Por ejemplo, los agentes de contraste radiopacos (para la obtención de imágenes

de rayos X) incluirán compuestos de yodo inorgánicos y orgánicos (por ejemplo, diatrizoato), metales radiopacos y sus sales (por ejemplo, plata, oro, platino y similares) y otros compuestos radiopacos (por ejemplo, sales de calcio, sales de bario tales como sulfato de bario, tántalo y óxido de tántalo). Los agentes de contraste paramagnéticos adecuados (para la obtención de imágenes por MR (siglas de resonancia magnética)) incluyen gadolinio-ácido dietilentriaminopentaacético (Gd-DTPA) y sus derivados, y otros complejos con gadolinio, manganeso, hierro, disprosio, cobre, europio, erbio, cromo, níquel y cobalto, incluyendo complejos con ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano -N,N',N''-triacético (DO3A), ácido 1,4,7-triazaciclononano-N,N',N''-triacético (NOTA), ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (TETA), ácido hidroxibenciletilen-diamino diacético (HBED) y similares. Los agentes de contraste superparamagnéticos adecuados (para la formación de imágenes por MR) incluyen magnetitas, óxidos de hierro superparamagnético, óxidos de hierro monocristalino, particularmente formas complejadas de cada uno de estos agentes que pueden unirse a una cadena principal cargada negativamente. Otros agentes de formación de imágenes adecuados adicionales son los agentes de contraste CT que incluyen agentes de contraste CT yodados y no yodados e iónicos y no iónicos, así como agentes de contraste tales como marcadores de spin u otros agentes eficaces desde el punto de vista del diagnóstico.

Otros ejemplos de agentes de diagnóstico incluyen genes marcadores que codifican proteínas que se pueden detectar fácilmente cuando se expresan en una célula, incluyendo, pero sin limitación,  $\beta$ -galactosidasa, proteína fluorescente verde, proteína azul fluorescente, luciferasa y similares. Puede emplearse una amplia diversidad de marcadores, tales como radionúclidos, flúor, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores de enzimas, ligandos (particularmente haptenos) y similares. Otras sustancias útiles son las marcadas con especies o componentes radiactivos tales como  $^{99m}\text{Tc}$  glucoheptonato.

#### *Agentes de dirección*

En las composiciones descritas en el presente documento son útiles una diversidad de agentes de dirección. Típicamente, los agentes de dirección están unidos a una cadena principal cargada negativamente como se ha descrito anteriormente para los restos de formación de imágenes. Los agentes de dirección pueden ser cualquier elemento que haga posible dirigir la transferencia de un ácido nucleico, agente terapéutico u otro componente de la composición a un sitio particular. El agente de dirección puede ser un agente de dirección extracelular que permite, por ejemplo, transferir un ácido nucleico a dirigir hacia ciertos tipos de células o ciertos tejidos deseados (células tumorales, células hepáticas, células hematopoyéticas y similares). Dicho agente también puede ser un agente de dirección intracelular que permite dirigir un agente terapéutico hacia compartimentos celulares particulares (por ejemplo, mitocondrias, núcleo y similares).

El agente o agentes de dirección preferentemente se unen, de forma covalente o no covalente, a una cadena principal cargada negativamente de acuerdo con la invención. De acuerdo con un modo preferido de la invención, el agente de dirección se une covalentemente a un oligonucleótido que sirve como componente de la cadena principal cargada negativamente, preferentemente a través de un grupo de enlace. Los expertos en la materia conocerán bien métodos para unir agentes de dirección (así como otros agentes biológicos) a ácidos nucleicos usando, por ejemplo, grupos de unión heterobifuncionales (véase Pierce Chemical Catalog). En un grupo de realizaciones, el agente de dirección es un péptido fusogénico para promover la transfección celular, es decir para favorecer el paso de la composición o sus diversos elementos a través de las membranas, o para ayudar en la salida de los endosomas o para atravesar la membrana nuclear. El agente de dirección también puede ser un ligando de un receptor celular para un receptor que esté presente en la superficie del tipo celular, tal como, por ejemplo, un azúcar, transferrina, insulina o proteína asialo-orosomucoide. Dicho ligando también puede ser uno de tipo intracelular, tal como una secuencia señal de localización nuclear (nls) que promueve la acumulación de ADN transfectado dentro del núcleo.

Otros agentes de dirección útiles en el contexto de la invención incluyen azúcares, péptidos, hormonas, vitaminas, citocinas, oligonucleótidos, lípidos o secuencias o fracciones derivadas de estos elementos y que permiten la unión específica a sus receptores correspondientes. Preferentemente, los agentes de dirección son azúcares y/o péptidos tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, ligandos de receptores celulares o fragmentos de los mismos, receptores o fragmentos de receptores y similares. Más preferentemente, los agentes de dirección son ligandos de receptores de factores de crecimiento, de receptores de citocinas o de receptores celulares de lectina o de receptores de proteínas de adhesión. El agente de dirección también puede ser un azúcar que hace que sea posible fijar como diana lectinas tales como los receptores de asialoglicoproteína o, como alternativa, un fragmento Fab de anticuerpo que hace que sea posible fijar como diana el receptor del fragmento Fc de inmunoglobulinas.

#### *Ácidos nucleicos*

En las composiciones de la presente divulgación, el ácido nucleico puede ser un ácido desoxirribonucleico o un ácido ribonucleico, y puede comprender secuencias de origen natural o artificial. Más particularmente, los ácidos nucleicos usados en la presente invención pueden incluir ADN genómico, ADNc, ARNm, ARNt, ARNr, secuencias híbridas o secuencias sintéticas o semi-sintéticas. Estos ácidos nucleicos pueden ser de origen humano, animal, vegetal, bacteriano, vírico, etc. Además, los ácidos nucleicos pueden obtenerse por cualquier técnica conocida por los expertos en la materia y, en particular, mediante la exploración de bancos, por síntesis química o por métodos

mixtos que incluyen la modificación química o enzimática de secuencias obtenidas mediante la exploración de bancos. Además, los ácidos nucleicos pueden incorporarse en vectores, tales como vectores plasmídicos.

5 Los ácidos desoxirribonucleicos usados en la presente divulgación pueden ser mono- o bicatenarios. Estos ácidos desoxirribonucleicos también pueden codificar genes terapéuticos, secuencias para regular la transcripción o replicación, secuencias anti-sentido, regiones para la unión a otros componentes celulares, etc. Los genes terapéuticos adecuados son esencialmente cualquier gen que codifique un producto proteico que tiene un efecto terapéutico. El producto proteico codificado de esta manera puede ser una proteína, polipéptido, péptido o similar. El producto proteico, en algunos casos, puede ser homólogo con respecto a la célula diana (es decir, un producto que normalmente se expresa en la célula diana cuando esta última no presenta patología). De esta manera, el uso de ácidos nucleicos adecuados puede aumentar la expresión de una proteína, haciendo posible, por ejemplo, solucionar una expresión insuficiente en la célula. Como alternativa, la presente divulgación proporciona composiciones y métodos para la expresión de una proteína que es inactiva o débilmente activa debido a una modificación o, como alternativa, de la sobreexpresión de la proteína. De esta manera, el gen terapéutico puede codificar un mutante de una proteína celular, que tiene mayor estabilidad, actividad modificada, etc. El producto proteico también puede ser heterólogo con respecto a la célula diana. En este caso, una proteína expresada puede constituir o proporcionar, por ejemplo, una actividad que es deficiente en la célula, lo cual permite combatir una patología o estimular una respuesta inmunitaria.

20 Más particularmente, son ácidos nucleicos útiles en la presente divulgación los que codifican enzimas, derivados sanguíneos, hormonas, linfocinas, interleucinas, interferones, TNF, factores de crecimiento, neurotransmisores o sus precursores o enzimas sintéticas, o factores tróficos: BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, VEGF, NT3, NT5, HARP/pleiotrofina; las proteínas implicadas en el metabolismo de lípidos, de tipos de apolipoproteínas seleccionados de entre apolipoproteínas A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E, F, G, H, J y apo(a), enzimas metabólicas tales como, por ejemplo, lipoproteína lipasa, lipasa hepática, lecitin colesterol aciltransferasa, 7- $\alpha$ -colesterol hidroxilasa, ácido fosfatídico fosfatasa, o proteínas de transferencia de lípidos tales como la proteína de transferencia de éster de colesterol y proteína de transferencia de fosfolípidos, una proteína para la unión a HDL o un receptor seleccionado, por ejemplo, entre receptores de LDL, receptores de remanentes de quilomicrones, y receptores escoba (scavenger), distrofina o minidistrofina, proteína GAX, proteína CFTR asociada con mucoviscidosis, genes supresores de tumores: p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev; factores de proteína implicados en la coagulación: factores VII, VIII, IX; o los ácidos nucleicos pueden ser los genes implicados en la reparación del ADN, genes suicidas (timidina quinasa, citosina desaminasa), genes que codifican trombosmodulina;  $\alpha$ 1-antitripsina, activador de plasminógeno tisular, superóxido dismutasa, elastasa, metaloproteínasa de matriz y similares.

35 Los genes terapéuticos útiles en la presente divulgación también pueden ser una secuencia antisentido o un gen cuya expresión en la célula diana hace posible controlar la expresión de genes o la transcripción del ARNm celular. Dichas secuencias pueden transcribirse, por ejemplo, en la célula diana dando un ARN complementario al ARNm celular y de esta manera bloquear su traducción en proteínas, de acuerdo con la técnica descrita en la patente EP 140.308. Las secuencias antisentido también comprenden las secuencias que codifican ribozimas que son capaces de destruir de forma selectiva el ARN diana (véase el documento EP 321.201).

45 Como se ha indicado anteriormente, el ácido nucleico también puede contener uno o más genes que codifican un péptido antigénico, capaz de generar una respuesta inmunitaria en seres humanos o animales. En esta realización particular, la divulgación de esta manera hace posible producir vacunas o tratamientos inmunoterapéuticos aplicados a seres humanos o a animales, en particular contra microorganismos, virus o cánceres. Particularmente pueden ser péptidos antigénicos específicos para el virus Epstein Barr, para el virus VIH, para el virus de la hepatitis B (véase el documento EP 185.573), para el virus de la pseudorrabia o, como alternativa, específicos para tumores (véase el documento EP 259.212).

50 Preferentemente, el ácido nucleico también comprende secuencias que permiten la expresión del gen terapéutico y/o del gen que codifica el péptido antigénico en la célula u órgano deseado. Estas pueden ser secuencias que son responsables de forma natural de la expresión del gen considerado cuando estas secuencias son capaces de funcionar en la célula infectada. Los ácidos nucleicos también pueden ser secuencias de diferente origen (responsables de la expresión de otras proteínas, o incluso proteínas sintéticas). En particular, los ácidos nucleicos pueden contener secuencias promotoras para genes eucariotas o virales. Por ejemplo, las secuencias promotoras pueden ser las derivadas del genoma de la célula que se desea infectar. De forma similar, las secuencias promotoras pueden proceder del genoma de un virus, por ejemplo, los promotores de los genes E1A, MLP, CMV, RSV, etc. Además, estas secuencias de expresión pueden modificarse por la adición de secuencias de activación, secuencias de regulación, etc.

60 Además, el ácido nucleico también puede contener, en particular cadena arriba del gen terapéutico, una secuencia señal que dirige el producto terapéutico sintetizado a rutas de secreción de la célula diana. Esta secuencia señal puede ser la secuencia señal natural del producto terapéutico, pero también puede ser cualquier otra secuencia señal funcional, o una secuencia señal artificial.

65 *ADN que codifica al menos un factor de persistencia*



En algunas realizaciones, la composición también comprenderá ADN que codifica al menos un factor de persistencia. Es un ejemplo de dicho ADN el ADN que codifica la proteína 1 preterminal de adenovirus (véase, Lieber, et al. Nature Biotechnology 15(13): 1383-1387 (1997)).

##### 5 *Agentes biológicos*

En la presente divulgación son útiles una diversidad de agentes biológicos, incluyendo tanto agentes terapéuticos como agentes cosmeceúticos y están presentes en una cantidad eficaz que dependerá de la afección a tratar, desde el punto de vista profiláctico o de otra manera, la vía de administración, la eficacia del agente y las dimensiones y la susceptibilidad del paciente al régimen de tratamiento.

Los agentes terapéuticos adecuados que pueden unirse a una cadena principal cargada negativamente pueden encontrarse esencialmente en cualquier clase de agentes, incluyendo, por ejemplo, agentes analgésicos, agentes anti-asmáticos, antibióticos, agentes antidepresivos, agentes antidiabéticos, agentes antifúngicos, antieméticos, antihipertensivos, agentes contra la impotencia, agentes antiinflamatorios, agentes antineoplásicos, agentes anti-VIH, agentes antivirales, agentes ansiolíticos, agentes anticonceptivos, agentes de fertilidad, agentes antitrombóticos, agentes protrombóticos, hormonas, vacunas, agentes inmunosupresores, vitaminas y similares.

Los agentes cosmeceúticos adecuados incluyen, por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), así como la hormona de crecimiento humana, antioxidantes y BOTOX.

Más particularmente, los agentes terapéuticos útiles en la presente divulgación incluyen analgésicos tales como lidocaína, novacaína, bupivacaína, procaína, tetracaína, benzocaína, cocaína, mepivacaína, etidocaína, proparacaína ropivacaína, prilocaína y similares; agentes anti-asmáticos tales como azelastina, ketotifeno, traxanox, corticosteroides, cromolyn, nedocromil, albuterol, mesilato de bitolterol, pirbuterol, salmeterol, terbutilina, teofilina y similares; agentes antibióticos tales como neomicina, estreptomina, cloranfenicol, norfloxacin, ciprofloxacina, trimetoprim, sulfametiloaxazol, los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, tetraciclina, y similares; agentes antidepresivos tales como nefopam, oxipertina, imipramina, trazadona y similares; agentes antidiabéticos tales como biguanidinas, sulfonilureas, y similares; antieméticos y antipsicóticos tales como clorpromazina, flufenazina, perfenazina, proclorperazina, prometazina, tietilperazina, triflupromazina, haloperidol, escopolamina, difenidol, trimetobenzamida y similares; agentes neuromusculares tales como atracurio mivacurio, rocuronio, succinilcolina, doxacurio, tubocurarina y toxina botulínica (BOTOX); agentes antifúngicos tales como anfotericina B, nistatina, candicidina, itraconazol, ketoconazol, miconazol, clotrimazol, fluconazol, ciclopirox, econazol, naftifina, terbinafina, griseofulvina y similares; agentes antihipertensivos tales como propanolol, propafenona, oxiprenolol, nifedipina, reserpina y similares; agentes contra la impotencia tales como donadores de óxido nítrico y similares; agentes antiinflamatorios incluyendo antiinflamatorios esteroideos tales como cortisona, hidrocortisona, dexametasona, prednisolona, prednisona, fluzacort y similares, así como agentes antiinflamatorios no esteroideos tales como indometacina, ibuprofeno, ramifenazona, piroxicam y similares; agentes antineoplásicos tales como adriamicina, ciclofosfamida, actinomicina, bleomicina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, mitomicina, rapamicina, metotrexato, fluorouracilo, carboplatino, carmustina (BCNU), cisplatino, etopósido, interferones, fenesterina, taxol (incluyendo análogos y derivados), camptotecina y derivados de la misma, vinblastina, vincristina y similares; agentes anti-VIH (por ejemplo, antiproteolíticos); agentes antivirales tales como amantadina, metisazona, idoxuridina, citarabina, aciclovir, famiclovir, ganciclovir, foscarnet, sorivudina, trifluridina, valaciclovir, cidofovir, didanosina, estavudina, zalcitabina, zidovudina, ribavirina, rimantadina y similares; agentes ansiolíticos tales como dantroleno, diazepam y similares; inhibidores de COX-2; agentes anticonceptivos tales como progestógenos y similares; agentes antitrombóticos tales como inhibidores de GPIIb/IIIa, activadores de plasminógeno tisular, estreptoquinasa, uroquinasa, heparina y similares; agentes protrombóticos tales como trombina, factores V, VII, VIII y similares; hormonas tales como insulina, hormona de crecimiento, prolactina, EGF (factor de crecimiento epidérmico) y similares; agentes inmunosupresores tales como ciclosporina, azatioprina, mizorobina, FK506, prednisona y similares; agentes angiogénicos tales como VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular); vitaminas tales como A, D, E, K y similares; y otros agentes activos desde el punto de vista terapéutico o médico. Véase, por ejemplo, GOODMAN & GILMAN'S THE FARMACOLOGICAL BASIS OF TERAPEUTICS, Nint Ed. Hardman, et al., eds. McGraw-Hill, (1996).

En la presente invención, el agente biológico se selecciona entre insulina, toxina botulínica (BOTOX), VEGF, EGF, anticuerpos contra VEGF y TGF- $\beta$ 1.

Cadenas principales cargadas negativamente que tienen restos de formación imágenes unidos, agentes de dirección o agentes terapéuticos

Para los tres grupos anteriores de componentes (restos de formación de imágenes, agentes de dirección y agentes terapéuticos), los compuestos individuales se unen a una cadena principal cargada negativamente. Típicamente, la unión es a través de un grupo de enlace usado para unir covalentemente el agente particular a la cadena principal a través de grupos funcionales presentes en el agente, así como en la cadena principal. En este aspecto de la invención son útiles una diversidad de grupos de unión. Véase, por ejemplo, Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, CA (1996); Wong, S.S., Ed., Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC

Press, Inc., Boca Raton, FL (1991); Senter, et al., J. Org. Chem. 55: 2975-78 (1990); y Koneko, et al., Bioconjugate Chem. 2: 133-141 (1991).

5 En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos, de diagnóstico o de dirección no tendrán un grupo funcional disponible para unirse a un grupo de unión, y pueden modificarse primero para incorporar, por ejemplo, un sustituyente hidroxilo, amino o tiol. Preferentemente, el sustituyente se proporciona en una parte no interferente del agente, y puede usarse para unir un grupo de unión, y no afectará de forma adversa a la función del agente.

10 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones que comprenden un complejo de asociación no covalente de una cadena principal cargada positivamente que tiene al menos un grupo de eficacia unido y al menos un miembro de ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en ARN, ADN, ribozimas, oligonucleótidos modificados y ADNc que codifica un transgén seleccionado. En este aspecto de la divulgación, la cadena principal cargada positivamente puede ser esencialmente cualquiera de las cadenas principales cargadas positivamente  
15 descritas anteriormente, y también comprenderá (como ocurre con las cadenas principales seleccionadas anteriores) al menos un grupo de eficacia unido. Los grupos de eficacia adecuados incluyen, por ejemplo, (Gly)<sub>n1</sub>-(Arg)<sub>n2</sub> (donde el subíndice n1 es un número entero de 3 a aproximadamente 5, y el subíndice n2 es un número impar de aproximadamente 7 a aproximadamente 17) o dominios TAT. Además, los ácidos nucleicos útiles en este aspecto de la divulgación son los mismos que se han descrito anteriormente.

#### 20 Métodos para preparar las composiciones

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para preparar una composición farmacéutica, comprendiendo el método combinar un componente de cadena principal cargado positivamente y al menos dos miembros seleccionados de entre:

- 25
- i) una primera cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de restos de formación de imágenes unidos;
  - ii) una segunda cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes de dirección unidos;
  - 30 iii) al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en ARN, ADN, ribozimas, oligonucleótidos modificados y ADNc que codifica un transgén seleccionado;
  - iv) ADN que codifica al menos un factor de persistencia; y
  - v) una tercera cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes terapéuticos unidos;
  - 35 con un vehículo farmacéuticamente aceptable para formar un complejo de asociación no covalente que tiene una carga neta positiva, con la condición de que al menos uno de los dos miembros de los grupos i) a v) se seleccione entre los grupos i), iii) o v).

La amplia aplicabilidad de la presente divulgación se ilustra por la facilidad con la que pueden formularse una diversidad de composiciones farmacéuticas. Típicamente, las composiciones se preparan mezclando el componente  
40 de cadena principal cargada positivamente con los componentes deseados de interés (por ejemplo, ADN o componentes de dirección, de formación de imágenes o terapéuticos) en relaciones y en una secuencia adecuados para obtener composiciones con una carga neta positiva variable. En muchas realizaciones, las composiciones pueden prepararse, por ejemplo, justo antes de administrarse al paciente usando vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables para la administración de la composición. Como alternativa, las composiciones  
45 pueden prepararse mezclando de manera adecuada los componentes y después liofilizando y almacenando (típicamente a temperatura ambiente o a una temperatura inferior) la composición obtenida hasta que se use o se formule en un vehículo de liberación adecuado.

Las composiciones pueden formularse para proporcionar mezclas adecuadas para administración tópica, cutánea,  
50 oral, rectal, vaginal, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraocular, transdérmica, etc. Las composiciones farmacéuticas de la divulgación preferentemente contienen un vehículo que es farmacéuticamente aceptable para una formulación inyectable, en particular para la inyección directa en el órgano deseado, o para administración tópica (en la piel y/o membrana mucosa). En particular, pueden ser soluciones isotónicas estériles o composiciones deshidratadas, en particular composiciones liofilizadas que, mediante la  
55 adición, dependiendo el caso, de agua esterilizada o de solución fisiológica salina, permiten preparar soluciones inyectables. Por ejemplo, las dosis de ácido nucleico usadas para la inyección y el número de administraciones pueden adaptarse de acuerdo con diversos parámetros y, en particular, de acuerdo con el modo de administración usado, la patología relacionada, el gen a expresar o, como alternativa, la duración deseada del tratamiento.

#### 60 Métodos de uso de las composiciones

##### Métodos de liberación

65 Las composiciones de la presente invención pueden administrarse a un sujeto, célula o sitio diana, *in vivo* o *ex vivo* usando una diversidad de métodos. De hecho, puede usarse cualquiera de las vías usadas normalmente para introducir una composición en contacto último con el tejido a tratar. Preferentemente, las composiciones se

administrarán con vehículos farmacéuticamente aceptables. Están disponibles métodos adecuados de administración de dichos compuestos y serán bien conocidos para los expertos en la materia y, aunque puede usarse más de una vía para administrar una composición particular, una vía particular a menudo puede proporcionar una reacción más inmediata y más eficaz que otra vía. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan

5 en parte por la composición particular a administrar, así como por el método particular usado para administrar la composición. Por consiguiente, existe una amplia diversidad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas de la presente invención (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed. 1985).

La administración puede ser, por ejemplo, intravenosa, tópica, intraperitoneal, subdérmica, subcutánea, transcutánea, intramuscular, oral, intraarticular, parenteral, intranasal o por inhalación. De esta manera, los sitios de administración adecuados incluyen, pero sin limitación, la piel, bronquios, tracto gastrointestinal, ojo y oído. Las composiciones típicamente incluyen un vehículo o excipiente farmacéutico convencional y además pueden incluir otros agentes medicinales, vehículos, adyuvantes y similares. Preferentemente, la formulación constituirá de aproximadamente un 5 % a un 75 % en peso de una composición de la invención, consistiendo el resto en excipientes farmacéuticos adecuados. Los excipientes apropiados pueden adaptarse a la composición y vía de administración particular por métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)).

10  
15

Las formulaciones pueden tomar la forma de formas farmacéuticas sólidas, semi-sólidas, en polvo liofilizado o líquidas, tales como, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones, emulsiones, supositorios, enemas de retención, cremas, pomadas, lociones, aerosoles o similares. En realizaciones en las que la composición farmacéutica toma la forma de una píldora, comprimido o cápsula, la formulación puede contener, junto con la composición biológicamente activa, cualquiera de los siguientes: un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico y similares; un disgregante tal como almidón o derivados del mismo; un lubricante tal como estearato de magnesio y similares; y un aglutinante tal como almidón, goma arábica, polivinilpirrolidona, gelatina, celulosa y derivados de los mismos. Las composiciones pueden presentarse en recipientes sellados de una sola dosis o de múltiples dosis, tales como ampollas o viales. Las dosis administradas a un paciente deben ser suficientes para producir una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente a lo largo del tiempo.

20  
25

En algunas realizaciones, puede administrarse una formulación de liberación sostenida a un organismo o a células en cultivo y pueden llevar las composiciones deseadas. La composición de liberación sostenida puede administrarse al tejido de un organismo, por ejemplo, por inyección. Por "liberación sostenida" se entiende que la composición, preferentemente una que codifica un transgén de interés o un agente terapéutico, está disponible para la captación por el tejido circundante o las células en cultivo durante un periodo de tiempo mayor que el que se conseguiría mediante la administración de la composición en un medio menos viscoso, por ejemplo, una solución salina.

30  
35

Las composiciones, solas o en combinación con otros componentes adecuados, pueden transformarse en formulaciones de aerosol (es decir, pueden "nebulizarse") para administrarse por inhalación. Las formulaciones de aerosol pueden ponerse en propulsores aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares. Para la liberación por inhalación, las composiciones también pueden suministrarse como polvo seco (por ejemplo, Inhale Therapeutics).

40

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral, tal como, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica y subcutánea, incluyen soluciones de inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes.

45

Otros métodos de administración incluyen, pero sin limitación, la administración usando balones de angioplastia, catéteres y formaciones de gel. En la técnica se conocen bien métodos para la liberación mediante balones de angioplastia, catéteres y formación de gel.

50

#### Métodos de formación de imágenes

Un experto en la materia comprenderá que las composiciones de la presente invención pueden adaptarse a una diversidad de usos de formación de imágenes. En una realización, puede realizarse una colonoscopia virtual usando el sistema basado en componentes para obtener las imágenes. En el momento actual, la colonoscopia virtual implica esencialmente infundir contraste en un colon y visualizar las imágenes en CT, reconstruyéndose después una imagen 3-D. Podrían emplearse técnicas similares para MR. Sin embargo, las heces, la mucosa y el aire actúan como barreras de contraste y pueden proporcionar una superficie artificial en la reconstrucción de la pared del colon. La adición de un contraste que se dirigiera a las células ayudaría a superar estas barreras proporcionando una reconstrucción de la pared real y ayudando a evitar tanto falsos positivos como falsos negativos. Hay varias formas en las que el sistema basado en componentes podría aplicarse en esta situación. Lo más sencillo es que la cadena principal de eficacia catiónica pudiera aplicarse con un solo agente de contraste (CT o MR). De esta manera, la capa de superficie celular podría visualizarse y podría detectarse cualquier irregularidad u obstrucción en la reconstrucción de la imagen. Sin embargo, el sistema basado en componentes ofrece la opción adicional de añadir

55  
60  
65

un segundo agente específico. Este agente podría consistir en una cadena principal de eficacia catiónica, un resto de formación de imágenes diferente y componentes de dirección (por ejemplo, dirección a dos antígenos característicos del cáncer de colon). Los restos de formación de imágenes (desde el sencillo hasta el de diagnóstico) podrían seleccionarse de manera que uno fuera el contraste para CT y el otro el contraste para MR, o de tal forma que los dos fueran contraste para MR siendo uno un agente T2 y siendo el otro un agente T1. De esta manera, la superficie podría reconstruirse como se ha indicado anteriormente, y podría visualizarse cualquier región específica para un antígeno tumoral y superponerse sobre la reconstrucción original. Además, también podrían incorporarse agentes terapéuticos en el sistema de diagnóstico dirigido. Podrían aplicarse estrategias similares en la enteritis regional y en la colitis ulcerosa (y de nuevo combinarse con la terapia).

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra la preparación y evaluación de una composición que tiene una cadena principal cargada positivamente, una cadena principal cargada negativamente con restos de formación de imágenes unidos, y un ADNc que codifica un transgén. La evaluación es *in vitro*.

Se preparan los siguientes componentes:

1. una cadena principal cargada positivamente compuesta de polilisina con Gly<sub>3</sub>Arg<sub>7</sub> unida a través del extremo amino de la cadena lateral de Lys con el extremo carboxi de Gly<sub>3</sub>Arg<sub>7</sub> a un grado de saturación del 20 %. Se prepara una solución del resto de la cadena principal a una concentración de 1,5 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

2. se prepara un ADNc que expresa proteína fluorescente verde bajo el control de un promotor de citomegalovirus (CMV) y se usa a una concentración de 0,5 mg/ml en PBS.

3. se usa un complejo de dextrano-DOTA-gadolinio (véase, Casali, et al., Acad. Radiol. 5: S214-S218 (1998)) a una dilución 1:2 en PBS.

La siguiente mezcla (a) se prepara por triplicado: se mezclan 100 µl de "2" anterior con 60 µl de "3" anterior y la mezcla se diluye con 140 µl de PBS, y después se somete a agitación vortical durante 45 segundos.

Se preparan tres tubos diferentes con lo siguiente:

(b) 400 µl de "1" anterior, (c) 200 µl de "1" anterior, diluido con 200 µl de PBS y (d) 100 µl de "1" anterior diluido con 300 µl de PBS.

Los tres tubos se someten a agitación vortical durante 45 segundos. Un tubo de "a" se combina con cada uno de los tubos "b", "c" y "d" y se somete a agitación vortical durante 90 segundos. Una parte de 200 µl de cada una de estas mezclas combinadas se pone en un pocillo distinto (por triplicado) en una placa de cultivo celular de seis pocillos que contiene células HA-VSMC (ATCC, Rockville, MD). Cada pocillo se prelava una vez con medio M-199 sin colorante y sin suero antes de la transfección. Las mezclas de célula/agente de transfección se incuban a 37 °C en una cámara humidificada con un 10 % de CO<sub>2</sub> durante 4,5 horas, se lavan con medio M-199 y después se incuban con FBS al 10 %. Inmediatamente se obtienen imágenes en espectroscopia MR para la distribución inicial. Después de 24 horas, se repite la espectroscopia, después se retiran las células de la placa y se emplean para el análisis FACS con proteína azul fluorescente para determinar la eficacia de la transfección.

### Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra la preparación de una composición de la invención que es un complejo específico de tumor para realizar imágenes que lleva un gen citotóxico.

Se preparan los siguientes componentes:

1. una cadena principal cargada positivamente compuesta de polilisina con Gly<sub>3</sub>Arg<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 1) unida a través del extremo amino de la cadena lateral de Lys con el extremo carboxi de Gly<sub>3</sub>Arg<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 1) a un grado de saturación del 20 %. Se prepara una solución del resto de la cadena principal a una concentración de 1,5 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

2. se usa ADNc que expresa la timidina quinasa del virus del herpes simple bajo el control de un promotor de citomegalovirus (CMV) a una concentración de 0,5 mg/ml en PBS.

3. se usa complejo de dextrano-DOTA-gadolinio a una dilución 1:2 en PBS.

4. se conjuga el fragmento Fab específico para el antígeno tumoral deseado a un porcentaje de saturación del 5 % con dextrano de un intervalo de tamaños y se selecciona la concentración en PBS para producir una relación de carga negativa 1:2 con respecto al componente "2" anterior.

Se prepara la siguiente mezcla (a) por triplicado: 100  $\mu$ l de "2" anterior mezclados con 60  $\mu$ l de "3" anterior y 100  $\mu$ l de "4" anterior y se diluye con 40  $\mu$ l de PBS y se somete a agitación con vórtice durante 45 segundos. Se preparan tres tubos diferentes: (b) 400  $\mu$ l de "1" anterior, (c) 200  $\mu$ l de "1" anterior diluido con 200  $\mu$ l de PBS y (d) 100  $\mu$ l de "1" anterior diluido con 300  $\mu$ l de PBS. Se agitan con vórtice los tres tubos durante 45 segundos. Se combina un tubo de "a" con "b" y se agita con vórtice durante 90 segundos para formar la mezcla B. Se combina un tubo de "a" con "c" y se agita con vórtice durante 90 segundos para formar la mezcla C. Se combina un tubo de "a" con "d" y se agita con vórtice durante 90 segundos para formar la mezcla D. Se usan 200  $\mu$ l de cada mezcla junto con 200  $\mu$ l de pluronic F-127 (BASF) al 30 % frío. Se inyecta la solución combinada en un espacio potencial creado mediante biopsia de escisión del supuesto tumor *in vivo*. Se obtienen imágenes en MR después de la implantación, después de 1 día y después de 3 días. Inmediatamente después de la implantación, se inicia la administración sistémica de gancyclovir de acuerdo con las directrices de la FDA. Este sistema compuesto proporciona imágenes de diagnóstico de las células tumorales deseadas, así como una terapia citotóxica para estas mismas células. La distribución del gel (pluronic) se representa en imágenes a tiempo cero. Después de 24 horas, el gel se degrada y la señal de contraste se concentra en sitios de microinvasión tumoral residual, así como en sitios seminales a lo largo de las rutas de drenaje.

De esta manera se proporcionan imágenes del tumor residual. La actividad de gancyclovir se concentrará en áreas de captación de HSV-TK, de forma que en este sistema también se produce la terapia dirigida. De forma similar, también se proporciona la supervisión de la respuesta a la terapia mediante la obtención de imágenes.

### **Ejemplo 3**

Este ejemplo ilustra el uso de la estrategia de múltiples componentes para la transfección en un cultivo celular.

En este ejemplo, se usó una placa de 6 pocillos para evaluar una repetición de la estrategia basada en componentes. La cadena principal cargada positivamente se ensambló conjugando -Gly<sub>3</sub>Arg<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 1) con polilisina 150.000 a través del carboxilo de la glicina terminal con la amina libre de la cadena lateral de lisina a un grado de saturación del 18 % (es decir, 18 de cada 100 restos de lisina se conjugan con una -Gly<sub>3</sub>Arg<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 1). La cadena principal resultante se denominó NUNU-01.

Se prepararon las siguientes mezclas:

1) polilisina (150.000) a una relación de carga de 4:1 con una solución de 0,5 mg/ml de un plásmido que expresa proteína azul fluorescente dirigida por un promotor de CMV.

2) NUNU-01 a una relación de 15:1 con una solución de 0,5 mg/ml de un plásmido que expresa proteína azul fluorescente dirigida por un promotor de CMV.

3) NUNU-01 a una relación de 10:1 con una solución de 0,5 mg/ml de un plásmido que expresa proteína azul fluorescente dirigida por un promotor de CMV.

4) NUNU-01 a una relación de 4:1 con una solución de 0,5 mg/ml de un plásmido que expresa proteína azul fluorescente dirigida por un promotor de CMV.

5) NUNU-01 a una relación de carga de 1,25:1 con una solución de 0,5 mg/ml de un plásmido que expresa proteína azul fluorescente dirigida por un promotor de CMV.

6) Superfect (Qiagen) de acuerdo con la recomendación del fabricante a una relación de carga de 5:1 con una solución de 0,5 mg/ml de un plásmido que expresa proteína azul fluorescente dirigida por un promotor de CMV.

Se añadieron aproximadamente 1,0 ml de cada solución a células de músculo liso aórtico humano primario HA-VSMC confluentes al 70 % (pase 21; ATCC, Rocville, MD) en una placa de seis pocillos y se cultivaron en M-199 con suero al 10 % durante 48 horas. Se obtuvieron fotografías de pocos aumentos (10X en total) a 60 grados, 180 grados y 200 grados desde la parte superior de cada pocillo usando un microscopio de epi-fluorescencia Nikon E-600 con un filtro de proteína azul fluorescente y lentes Plan-Apochromat. Se empleó el equipo de análisis de imágenes Image Pro Plus 3.0 para determinar el porcentaje de área celular total que era positiva, y se presentó como la eficacia de la liberación de genes. Los pocillos posteriormente se evaluaron en un ensayo de exclusión de colorante (las células viables excluyen el colorante, mientras que las no viables no lo hacen), seguido de solubilización en SDS al 0,4 % en solución salina tamponada con fosfato. Las muestras se evaluaron en un espectrofotómetro UV/VIS Spectronic Genesys 5 a una longitud de onda de 595 nm (azul) para cuantificar las células no viables como una medida directa de la toxicidad del agente de transfección.

Los resultados para las eficacias se muestran a continuación (media +/- Desviación Típica):

- 1) 0,163 +/- 0,106 %
- 2) 10,642 +/- 2,195 %
- 3) 8,797 +/- 3,839 %
- 4) 15,035 +/- 1,098 %
- 5) 17,574 +/- 6,807 %
- 6) 1,199 +/- 0,573 %

Los ensayos n.º 4 y n.º 5 muestran una mejora estadísticamente significativa ( $P < 0,05$  mediante ANOVA de un factor con medidas repetidas con ensayo PLSD de Fisher y posthoc de TUKEY-A) de la eficacia de liberación de genes con respecto tanto a la polilisina solo como a Superfect. Los datos de toxicidad media son los siguientes:

5 Solución salina - 0,057 A; 1) 3,460 A; 2) 0,251 A; 3) 0,291 A; 4) 0,243 A 5) 0,297 A; y 6) 0,337 A

Como resultado, puede realizarse una liberación de genes menos tóxica y más eficaz con una relación de 1,25 a 4,0 entre NUNU-01 y ADN.

#### 10 **Ejemplo 4**

Este ejemplo ilustra la liberación transdérmica de agentes terapéuticos usando composiciones de la presente invención.

#### 15 **Biotinilación de K y KNR:**

Se biotinilaron cadenas principales de polilisina (K) y polilisina que tenía grupos de eficacia unidos (KNR) con ésteres de sulfo-NHS de biotina.

20 ***Materiales:*** se usaron proteína K y KNR, que tenían un PM aproximado = 112.000, con Sulfo-NHS-LC Biotina, PM = 556 (Pierce Scientific, Rockford, IL).

***Métodos:*** se usaron el mismo método y los mismos cálculos para K y KNR, ya que las dos tienen pesos moleculares similares. El método para KNR se detalla a continuación.

- 25 1. Se preparó solución madre de KNR a una concentración de 1 mg/ml ( $8,9 \times 10^{-6}$  mmol/ml) en solución salina tamponada con fosfato.  
2. Se preparó solución madre de Sulfo-NHS-LC-Biotina a una concentración de 10 mg/ml en agua desionizada inmediatamente antes del uso. Se calculó la cantidad de reactivo de biotina a añadir para generar un exceso molar de 40 veces de reactivo de biotina para una solución de proteína de 1 mg/ml.

30 ***Cálculo:***

- Mol de proteína \* exceso molar de 40 veces = mmol de Sulfo-NHS-LC-Biotina  $8,9 \times 10^{-6}$  mmol de Dextrano \* 40 veces =  $3,57 \times 10^{-4}$  mmol de reactivo Sulfo-NHS-LC-Biotina a añadir
- 35 =>  $3,57 \times 10^{-4}$  mmol de Sulfo-NHS-LC-Biotina \* 556 PM de Sulfo-NHS-LC Biotina = 1,98 mg de reactivo Sulfo-NHS-LC-Biotina a añadir. Por lo tanto, se añadieron 200 ml de solución madre de Sulfo-NHS-LC Biotina (total de 2,0 mg) a 1,0 ml de solución madre de KNR.

- 40 3. Se incubó el tubo de ensayo que contenía proteína y reactivo de biotina a temperatura ambiente durante 30 minutos.  
4. Se añadió la mezcla de reacción a un microdializador (límite de peso molecular de 30 KD, Pierce, Scientific, Rockford, IL) y se centrifugó a 4.000 x g para retirar la biotina que no había reaccionado. Se lavó y se volvió a dializar con 2,0 volúmenes de PBS. Se etiquetó el producto como "KNR-B".

#### 45 **Biotinilación de insulina:**

También se biotiniló insulina con ésteres sulfo-NHS de biotina.

50 ***Materiales:*** insulina, PM = 5733,5 (Sigma Chemical, St Louis, MO) y Sulfo-NHS-LC Biotina, PM = 556 (Pierce Scientific, Rockford, IL).

***Métodos:***

- 55 1. Se preparó solución madre de insulina a una concentración de 10 mg/ml ( $1,74 \times 10^{-3}$  mmol/ml de insulina) en solución salina tamponada con fosfato.  
2. Se preparó solución madre de Sulfo-NHS-LC-Biotina a una concentración de 10 mg/ml en agua desionizada inmediatamente antes del uso. Se calculó la cantidad de reactivo de biotina a añadir para generar un exceso molar de 12 veces de reactivo de biotina a una solución de proteína de 1 mg/ml.

60 ***Cálculo:***

- Se calcularon los mmoles de reactivo de biotina a añadir:

65 mol de proteína \* exceso molar de 12 veces = mmol de reactivo  $1,74 \times 10^{-3}$  mmol de insulina \* 12 veces =  $2,09 \times 10^{-2}$  mmol de reactivo de Sulfo-NHS-LC-Biotina a añadir

=>  $2,09 \times 10^{-2}$  mmol \* 556 PM de Sulfo-NHS-LC Biotina = 11,64 mg de reactivo de Sulfo-NHS-LC-Biotina a añadir.

5 Por lo tanto, se añadieron 1,164 ml de solución madre de Sulfo-NHS-LC-Biotina (total de 11,64 mg) a 1,0 ml de solución madre de insulina.

3. Se incubó el tubo de ensayo que contenía insulina y reactivo de biotina a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se etiquetó el producto como "insulina B".

10 Recolección de piel:

Se recogió la piel del lomo de un ratón C57BL hembra de 8 semanas de edad para tratamiento transdérmico para observar si la cadena principal biotinilada y/o la insulina atravesaban la piel.

15 Método:

1. Después de sacrificar un ratón C57BL6 en una cámara con CO<sub>2</sub>, se recogieron aproximadamente 6 cm<sup>2</sup> de piel dorsal del ratón usando unas tijeras quirúrgicas.
2. La piel se dividió en seis piezas uniformes y se puso cada una en un pocillo de una placa de 6 pocillos.
- 20 3. Se añadió medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) a cada pocillo de la placa.
4. Se preparó una placa de 24 pocillos para sujetar la piel recogida. Se pusieron piezas pequeñas de esponja en cada pocillo.
5. Se cortaron las muestras de piel recogidas en cinco secciones más pequeñas y se puso cada sección sobre la esponja.
- 25 6. Se sujetaron los bordes de la piel recogida con cuatro agujas.
7. Se añadió DMEM a cada pocillo, pero con cuidado de no sumergir la piel recogida en el medio.
8. Se incubó la placa en hielo hasta que los tratamientos estuvieran listos para aplicarse.

30 Preparación de tratamientos transdérmicos:

1. Se prepararon los seis siguientes tratamientos en 2 ml de loción de Cetaphil (Galderma):

TUBOS	AGENTE	CADENA PRINCIPAL BIOTINILADA (+/-)	AGENTE DE PROTEÍNA (INSULINA)	PROTEÍNA BIOTINILADA (+/-)
A.	KNR	+	1:1	-
B.	KNR	+	1:3	-
C.	K	+	1:1	-
D.	K	+	1:3	-
E.	K	-	1:3	+
F.	KNR	-	1:3	+

35 2. Para los tubos A a D, se añadieron 200 µg de KNR o K en 2 ml de loción Cetaphil a cada tubo y se mezcló uniformemente. Se añadió 1 ml de poli-L-lisina (K) sin biotina a cada tubo y se mezcló uniformemente.

3. Para el tubo E, se añadieron 200 µg de KNR en 2 ml de loción Cetaphil y se mezcló uniformemente.

4. Se realizó una dilución de 200 veces de insulina biotinilada añadiendo 5,11 µl en aproximadamente 995 µl de PBS.

Proteína calculada disuelta en PBS:

40  $KNR = 8,9 \times 10^{-9}$  mol/ml

$K = 8,9 \times 10^{-9}$  mol/ml

45  $Insulina = 1,74 \times 10^{-9}$  mol/ml

Proteína calculada en los tubos:

50  $KNR = 8,9 \times 10^{-9}$  mol/ml

$K = 8,9 \times 10^{-9}$  mol/ml

5. Para los tubos E y F, se añadieron 33 µl de solución de insulina biotinilada diluida y 70 µl de PBS y se mezcló uniformemente.
6. Para los tubos A y C, se añadieron 100 µl de insulina regular y se mezcló uniformemente.
7. Para los tubos B y D, se añadieron 33 µl de insulina regular y 70 µl de PBS y se mezcló uniformemente.

5

Puntos de tiempo de tratamientos:

1. Se retiró la placa de piel recogida de la incubación con hielo.
2. Se aplicó cada tubo a la columna apropiada de muestras de piel sujetas.
- 10 3. Se transfirió la piel recogida a un congelador a -35 °C al final de cada punto de tiempo de 15, 30, 60 minutos y 17 horas. Se mantuvo la piel recogida congelada durante una noche.
4. Se cogieron las muestras de piel recogida congeladas y se pusieron en incubación con hielo.
5. Se cortaron las muestras de piel recogida que se habían congelado en los puntos de tiempo indicados en tres secciones más pequeñas.
- 15 6. Se transfirió una sección a un tubo con formaldehído.
7. Se transfirió una segunda sección a un tubo vacío y se puso en el congelador para el almacenamiento.
8. Se congeló una tercera sección en compuesto O.C.T. en acetona líquida y solución de hielo seco. Se pusieron las muestras congeladas en el congelador para congelar las secciones.

20 *Material:* fosfato alcalino conjugado NeutraAvidin™ (Pierce Scientific, Rockford, IL), tampón Tris-HCl, pH = 7,2 (Pierce Scientific, Rockford, IL); solución de NBT/BCIP (Pierce Scientific, Rockford, IL).

Método:

1. Se añadieron 50 µl de NeutraAvidin™ y se enrasó el volumen a 50 ml con tampón Tris-HCl.
2. Se añadió 1 ml de NeutraAvidin™ y solución tampón a cada tubo de muestras de piel recogida.
3. Se procesaron los tubos de muestras de piel recogida durante 1 hora en la mezcla de NeutraAvidin™ y solución tampón.
4. Se añadió 1 ml de NBT/BCIP a cada nuevo tubo vacío y se etiquetó cada tubo.
- 30 5. Se retiró la piel de la mezcla de NeutraAvidin™ y solución tampón. Se aclaró la piel en PBS cuatro veces y se puso en tubos apropiados de NBT/BCIP.
6. Se procesaron los tubos de muestras de piel recogida durante 1 hora en la solución de NBT/BCIP.
7. Se aclaró la piel de nuevo en 1 ml de PBS frío.
8. Se almacenaron las muestras de piel recogida en los tubos etiquetados.
- 35 9. Se dividieron en dos partes las muestras de piel y se fotografió la cara por la que se habían dividido.

Resultados:

Formulación	Punto de tiempo	Figura	Notas
A	15 minutos	3	A1 - alto nivel de liberación de cadena principal de KNR a través de todas las capas
A	17 horas	4	A4 - alto nivel de liberación de cadena principal de KNR a través de todas las capas
C	15 minutos	5	C1 - liberación pasiva de cadena principal de K en folículos y capa externa de la epidermis
C	17 horas	6	C4 - nivel muy bajo de liberación de cadena principal de K
E	15 minutos	7	E1- nivel muy bajo de liberación de factor terapéutico por K
E	17 horas	8	E4 - nivel muy bajo de liberación de factor terapéutico por K
F	15 minutos	9	F1 - alto nivel de liberación de factor terapéutico a través de todas las capas por KNR
F	17 horas	10	F4 - alto nivel de liberación de factor terapéutico a través de todas las capas por KNR

40 Las Figuras 3-10 representan fotomicrografías representativas de resultados obtenidos 15 minutos (Figuras 3, 5, 7, 9) y 17 horas (Figuras 4, 6, 8, 10) después de la liberación de la formulación A (Figuras 3 y 4), formulación C (Figuras 5 y 6), formulación E (Figuras 7 y 8) y formulación F (Figuras 9 y 10). Los grupos de control que recibieron complejos con K como cadena principal cargada positivamente muestran una transferencia pasiva de bajo nivel de la cadena principal principalmente a los folículos (Figuras 5 y 6), pero prácticamente no muestran ninguna liberación de agente terapéutico (Figuras 7 y 8). Por el contrario, los grupos tratados con complejos que contenían KNR presentaban una liberación de alto nivel tanto de la cadena principal (Figuras 3 y 4) como del agente terapéutico (Figuras 9 y 10) a todos los niveles de la epidermis y la dermis. De esta manera, la formulación proporcionada en este ejemplo permite una liberación transdérmica eficaz de un agente terapéutico.

45



**Ejemplo 5**

Este ejemplo ilustra la liberación dirigida de una composición usando fragmentos F(ab)<sub>2</sub> unidos.

5 General:

Se escindió un anticuerpo IgG para generar un fragmento F(ab)<sub>2</sub>, y después se purificó para retirar la parte Fc y la IgG intacta. El fragmento F(ab)<sub>2</sub> después se condensó con un dextrano activado con aldehído (oxidado). El exceso de aldehído se inactivó con tris y los hidroxilos libres se fosforilaron para generar un dextrano-fosfato con una alta carga negativa con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> unidos covalentemente (denominado colectivamente "componente de dirección"). Después se formó un complejo de autoensamblaje entre este componente de dirección, insulina y la cadena principal cargada positivamente que tenía un componente de eficacia ("KNR"). Después se evaluó la capacidad del complejo autoensamblado de aumentar la liberación del complejo en células que llevaban el antígeno diana.

15 Escisión de F(ab)<sub>2</sub>:

Se generaron fragmentos F(ab)<sub>2</sub> que reconocían células de músculo liso mediante un producto de digestión por pepsina inmovilizada (Pierce Chemical, Rockford, IL) de IgG para la  $\alpha$ -actina de músculo liso (clon 1A9, DAKO, Carpinteria, CA).

20 Método:

- 25 1. Se dializó el clon 1A9 a 1 mg/ml frente a un tampón acetato sódico 20 mM a pH 4,5.
2. La pepsina inmovilizada se suministró como una suspensión acuosa al 50 % (v/v) que contenía glicerol al 50 % en acetato sódico 0,1 M, pH 4,5, más azida sódica al 0,05 %. Se mezcló la suspensión de gel de Pepsina-glicerol-agua por inversión.
3. Se añadieron 0,25 ml de suspensión al 50 % de Pepsina inmovilizada a un tubo de ensayo de vidrio (0,125 ml de gel de Pepsina inmovilizada).
- 30 4. Se añadieron 4,0 ml de acetato sódico 20 mM (pH 4,0) en agua desionizada ("tampón de digestión"). Se mezcló bien por inversión. Se separó el gel del tampón usando un separador de suero o centrifugación a aproximadamente 1000 x g durante cinco minutos. Se desechó el tampón y se repitió este procedimiento de lavado con otros 4,0 ml de tampón.
5. Se resuspendió la Pepsina inmovilizada en 0,5 ml de tampón de digestión.
- 35 6. Generación de Fragmentos: se añadió 1,0 ml de IgG de 1A9 dializada al tubo que contenía Pepsina Inmovilizada. Se incubó el tubo en un baño de agua con agitación a 37 °C a alta velocidad durante cuatro horas. Se mantuvo la mezcla constante de gel durante la incubación.
7. Se añadieron 1,5 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 al tubo de ensayo. Se separaron los fragmentos Fc y F(ab')<sub>2</sub> solubilizados y la IgG no digerida del gel de Pepsina Inmovilizada usando un tubo separador de suero. Se centrifugó a 1000 x g durante cinco minutos y se retiró el sobrenadante que contenía los fragmentos.
- 40

Purificación de F(ab)<sub>2</sub>:

La separación de fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de la IgG no digerida y de los fragmentos Fc se realizó usando una columna de Proteína A Inmovilizada.

**Materiales:** muestra de proteína constituida por Pepsina + Tris-HCl; Tampón A (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M (2,4 g usados), NaCl 0,15 M (8,8 g usados) y volumen ajustado con la cantidad suficiente de H<sub>2</sub>O desionizada hasta 1 litro y pH ensayado de 8,0); Tampón B (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M (0,676 g), ácido cítrico 0,1 M (22,5 ml), H<sub>2</sub>O desionizada (46,3 ml), pH ajustado a 4,5).

50 **Método:** (Nota: Uso de tampón A).

1. Se relleno una micropipeta con algodón de la manera más uniforme posible.
2. Se realizó una suspensión 1:1 de resina en tampón A. (Se añadieron 1000  $\mu$ l de tampón A en resina). Se vertió 1 ml de suspensión en la columna, se dejó que la columna fluyera hasta que se asentó. Una vez asentada, la columna se lavó con 10 ml de Tampón A).
- 55 3. Se añadió lentamente muestra de proteína a la columna.
4. Se eluyó el fragmento F(ab)<sub>2</sub> con 12 ml de tampón A. De esta manera, el volumen total de eluato de F(ab)<sub>2</sub> (incluyendo la carga de la columna) fue de 14,4 ml.
5. Se retiraron la IgG sin reaccionar y los fragmentos Fc de la columna con 1,5 ml de tampón B.
6. Se midió y se registró la absorbancia usando un espectrofotómetro (Spectronic Genesys 5) para confirmar la proteína en los eluatos. A continuación, se proporcionan los valores espectrónicos registrados:
- 60

FRACCIONES DE COLUMNA	VALORES
H <sub>2</sub> O	- 0,032
H <sub>2</sub> O y A	+ 0,009
H <sub>2</sub> O y B	+ 0,012

Concentración de F(ab)<sub>2</sub>:

- 5 El eluato de F(ab)<sub>2</sub> se purificó y concentró usando Precipitación de Proteína con Ácido Tricloroacético (TCA).

Método:

- 10 1. Se añadió un volumen igual de TCA al 20 % (p/v, en agua desionizada, Sigma Chemical, St Louis, MO) al eluato de la columna de F(ab)<sub>2</sub>.  
 2. Se incubó la muestra durante 30 minutos en hielo.  
 3. Se centrifugó la muestra en una microcentrífuga a 4000 x g durante 15 minutos a 4 °C.  
 4. Se retiró cuidadosamente todo el sobrenadante.  
 15 5. Se añadieron 300 µl de acetona fría a cada tubo y se centrifugó de nuevo a 4000 x g durante 5 minutos a 4 °C.  
 6. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar el F(ab)<sub>2</sub>.  
 7. Se suspendió el sedimento de proteína F(ab)<sub>2</sub> en 1,0 ml de solución salina tamponada con fosfato.

Acoplamiento de F(ab)<sub>2</sub> a dextrano activado con aldehído:

- 20 **Materiales:** kit de acoplamiento de dextrano activado con aldehído (Pierce, Rockford, IL).  
 [Nota: el dextrano activado con aldehído también puede generarse por tratamiento de dextrano con peryodato.]

Métodos:

- 25 1. Se puso el kit de acoplamiento de dextrano activado con aldehído a temperatura ambiente.  
 2. Se prepararon 0,5 ml de una solución madre de 64 mg/ml de cianoborohidruro sódico en solución salina tamponada con fosfato (32 mg en 0,5 ml).  
 3. Se preparó 1,0 ml de una solución madre de dextrano activado con aldehído de 5 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato.  
 30 4. Se añadió 1,0 ml de F(ab)<sub>2</sub> concentrado purificado de lo anterior a 1,0 ml de solución madre de dextrano activado con aldehído.  
 5. Se añadieron 0,2 ml de solución madre de cianoborohidruro sódico a la mezcla de aldehído-F(ab)<sub>2</sub>. Se mezcló por agitación vorticial y se incubó durante una noche en la oscuridad a temperatura ambiente.  
 6. Después de la incubación durante una noche, se bloquearon todos los grupos aldehído restantes añadiendo  
 35 0,5 ml de Tris-HCl 1,0 M, pH 7,2 a la mezcla de reacción. Se incubó la solución a temperatura ambiente durante 1 hora.  
 7. El producto se etiquetó como "F(ab)<sub>2</sub>(aact)-d-t" con un volumen total de 2,7 ml.  
 8. Se realizó un procedimiento idéntico usando 1,0 ml de agua desionizada en lugar de mezcla de F(ab)<sub>2</sub>. El producto se etiquetó como "d-t" y representa un control que no se dirige a un antígeno específico.

Fosforilación de F(ab)<sub>2</sub>(aact)-d-t:

- 45 1. Se preparó solución madre de ácido polifosfórico a 50 mg/ml (Acros Organics, Pittsburgh, PA) en agua desionizada.  
 2. Se añadieron 100 µl de solución madre de ácido polifosfórico a 1,0 ml de F(ab)<sub>2</sub>(aact)-d-t, y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente.  
 3. Se añadió mezcla de reacción a un microdializador (límite de peso molecular de 30 KD, Pierce, Scientific, Rockford, IL) y se centrifugó a 4.000 x g para retirar el ácido polifosfórico que no había reaccionado. Se lavó y se volvió a dializar con 2,0 volúmenes de PBS pH 7,4. El producto se etiquetó como "F(ab)<sub>2</sub>(aact)-d-t-p" y representa un polímero cargado negativamente con un fragmento F(ab)<sub>2</sub> unido para proporcionar la dirección.  
 50 4. Se realizó un procedimiento idéntico usando 1,0 ml de d-t en lugar de F(ab)<sub>2</sub>(aact)-d-t. El producto se etiquetó como "d-t-p" y representa un polímero cargado negativamente de control que no se dirige a un antígeno específico.

- 55 Dirección de la liberación del complejo terapéutico a células que llevan un antígeno particular (α-actina de células de músculo liso):

1. Se usaron conejos blancos de Nueva Zelanda macho (3,0-3,5 kg) de acuerdo con las directrices de los NIH e institucionales (n = 3 animales). Con anestesia general (inducción con ketamina/xilazina y mantenimiento con halotano), se aisló la arteria femoral común derecha y se expuso la adventicia circunferencialmente. Se introdujo un balón de angioplastia SAVVY de 2 mm x 2 cm (Cordis, Miami, FL) mediante arteriotomía en la arteria femoral superficial y se hizo avanzar hasta la arteria femoral común. El balón se infló a 6 atmósferas en dos ciclos de 1 minuto y después se extrajo.

2. 28 días después de la dilatación mecánica, las arterias se fijaron por perfusión y se recogieron. Las arterias recogidas (de aproximadamente 1,5 cm de longitud) se fijaron posteriormente en formalina tamponada neutra al 10 % durante 12-16 horas y se dividieron en tres segmentos iguales antes de incluirse en parafina. Se obtuvieron secciones transversales en serie (5 mm) desde la cara proximal (craneal) de cada segmento.

3. Se desparafinaron y se rehidrataron las secciones (n = 9 por grupo). Los sitios de unión no específicos se bloquearon con BLOTTO (Pierce Scientific, Rockford, IL) y se aclararon con solución salina tamponada con fosfato.

4. Los tratamientos etiquetados como "1p" y "2p" corresponden a las siguientes composiciones de tratamiento: [NOTA: "KNR-B" preparado como se ha indicado anteriormente]

	<b>Agente de eficacia (E)</b>	<b>Agente de dirección (T)</b>	<b>Proteína (P)</b>	<b>Relación E:T:P</b>
1p	KNR - B	F(ab)2(aact)-d-t-p	Insulina	2:1:1
2p	KNR - B	d-t-p	Insulina	2:1:1

Se mezclaron 180 µl de solución salina tamponada con fosfato, 5 µl de agente terapéutico de proteína y 5 µl de agente de dirección (ambos con carga neta negativa en la superficie) en un tubo de microcentrífuga y la mezcla se sometió a agitación vorticial durante 15 segundos. Se añadieron 10 µl de agente de dirección (cargado positivamente) y el conjunto se sometió a agitación vorticial inmediatamente durante 60 segundos. Usando métodos de atracción capilar, se incubaron 9 secciones, cada una con 1p o 2p, a temperatura ambiente durante una noche.

5. Los portaobjetos se aclararon y se incubaron durante una noche en una dilución 1:100 de Neutravidina-fosfatasa alcalina (Pierce Scientific, Rockford, IL).

6. Los portaobjetos se aclararon y se incubaron en NBT/BCIP (Pierce Scientific, Rockford, IL; sustrato para fosfatasa alcalina) durante 15 minutos. Se aclaró con solución salina y se fotografió.

Como se muestra en la Figura 11, las secciones de los tratamientos con 1P revelan un aumento en la tinción positiva (azul-morado) en el medio de las secciones transversales (principalmente compuestas de células de músculo liso que llevan altos niveles de α-actina) con respecto a las secciones con 2P que muestran una tinción más intensa en la adventicia, y no revelan un aumento específico de la dirección para las células del músculo liso, como se representa en la Figura 12. De esta manera, los complejos que llevan F(ab)2(aact)-dtp presentan aumentos relativos en la liberación específica en las células del músculo liso y, por lo tanto, la liberación de los agentes terapéuticos puede tener las mejoras en eficacia deseadas para células que llevan antígenos particulares.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un complejo de asociación no covalente de:

- 5 (a) una cadena principal polimérica cargada positivamente que tiene unida covalentemente a la misma una pluralidad de secuencias de aminoácidos cargadas positivamente seleccionadas de  $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ , en la que  $n1$  es un número entero de 0 a 20 y  $n2$  es un número entero impar de 5 a 25;  $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$ ;  $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$ , en la que los subíndices  $p$  y  $q$  son cada uno, independientemente, un número entero de 0 a 20; o un dominio peptídico TAT de VIH cargado positivamente; y
- 10 (b) al menos dos miembros seleccionados del grupo que consiste en:

- i) una primera cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de restos de formación de imágenes unidos;
- 15 ii) una segunda cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes de dirección unidos; y
- iii) una tercera cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes biológicos unidos; en la que cada uno de dichos agentes biológicos es un agente terapéutico o cosmeceútico seleccionado del grupo que consiste en toxina botulínica, EGF, TGF- $\beta$ 1, insulina, VEGF, un bloqueante de VEGF y anticuerpos contra VEGF;
- 20 donde dicho complejo de asociación no covalente lleva una carga neta positiva y al menos uno de dichos dos miembros de (b) se selecciona entre el grupo i) o el grupo iii).

2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende al menos tres miembros seleccionados de los grupos i) a iii).

25

3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que al menos un miembro de (b) es del grupo ii).

4. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende al menos un miembro de cada uno de los grupos (i) y (ii).

30

5. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende al menos un miembro de cada uno de los grupos (ii) o (iii).

6. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha cadena principal cargada positivamente tiene una longitud de aproximadamente 1 a 4 veces las longitudes combinadas de dichos miembros de (b).

35

7. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha cadena principal polimérica cargada positivamente es polilisina.

40 8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicha secuencia de aminoácidos cargada positivamente es  $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$ , en la que los subíndices  $p$  y  $q$  son cada uno, independientemente, números enteros de 0 a 20 y donde dicha secuencia de aminoácidos cargada positivamente está unida a dicha cadena principal polimérica cargada positivamente a través del extremo C o el extremo N de la secuencia de aminoácidos.

45

9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en la que los subíndices  $p$  y  $q$  son cada uno, independientemente, números enteros de 0 a 8.

10. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en la que los subíndices  $p$  y  $q$  son cada uno, independientemente, números enteros de 2 a 5.

50

11. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicha secuencia de aminoácidos cargada positivamente es  $-\text{gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg}$  (SEQ ID NO: 1), que está unida covalentemente a la cadena principal polimérica de polilisina.

55

12. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la cadena principal polimérica cargada positivamente es polilisina que tiene unida covalentemente a la misma una pluralidad de grupos de eficacia cargados positivamente que tienen la secuencia de aminoácidos  $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ , en la que  $n1$  es un número entero de 2 a 5 y  $n2$  es un número entero impar de 7 a 17.

60

13. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12, en la que dicha cadena principal de polilisina cargada positivamente que tiene al menos un grupo de eficacia unido tiene un peso molecular de 150.000 a 300.000 y tiene una pluralidad de grupos de eficacia  $\text{Gly}_3\text{Arg}_7$  (SEQ ID NO: 1) unidos, en la que el grado de saturación de lisina es de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 30 %.

65

14. Una composición para uso en un método de liberación de un agente biológico en una superficie celular en un sujeto, donde la composición comprende un complejo de asociación no covalente de:

(a) una cadena principal polimérica cargada positivamente que tiene unidos covalentemente a la misma uno o más grupos de eficacia seleccionados de entre secuencias de aminoácidos  $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ , en la que  $n1$  es un número entero de 0 a 20 y  $n2$  es un número entero impar de aproximadamente 5 a aproximadamente 25;  $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRRQRRR}-(\text{gly})_q$ ;  $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRRQRRR}-(\text{gly})_q$ , en la que  $p$  y  $q$  son cada uno, independientemente, un número entero de 0 a 20; o un dominio peptídico TAT de VIH cargado positivamente; y

(b) al menos dos miembros seleccionados del grupo que consiste en:

i) una primera cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de restos de formación de imágenes unidos;

ii) una segunda cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes de dirección unidos; y

iii) una tercera cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes biológicos terapéuticos o cosmeceúticos unidos seleccionados del grupo que consiste en toxina botulínica, EGF, TGF- $\beta$ 1, insulina, VEGF, un bloqueante de VEGF y anticuerpos contra VEGF;

en la que dicho complejo de asociación no covalente lleva una carga neta positiva y al menos uno de los dos miembros del grupo (b) es el grupo (iii).

15. La composición de acuerdo con la reivindicación 14, en la que dicho método de liberación es la administración intravenosa.

16. La composición de acuerdo con la reivindicación 14, en la que dicho método de liberación es la administración transdérmica o tópica.

17. La composición de acuerdo con la reivindicación 14, en la que dicho método de liberación es una administración que usa un balón de angioplastia.

18. La composición de acuerdo con la reivindicación 14, en la que dicho método de liberación es una administración que usa un catéter.

19. La composición de acuerdo con la reivindicación 14, en la que dicho método de liberación es la administración intraperitoneal.

20. La composición de acuerdo con la reivindicación 14, en la que dicha composición está en una formulación de gel.

21. Un método para preparar una composición farmacéutica, comprendiendo dicho método combinar un componente de cadena principal polimérica cargada positivamente que tiene unida covalentemente a la misma una pluralidad de secuencias de aminoácidos cargadas positivamente seleccionadas de entre  $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ , en la que  $n1$  es un número entero de 0 a 20 y  $n2$  es un número entero impar de 5 a 25;  $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRRQRRR}-(\text{gly})_q$ ; o  $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRRQRRR}-(\text{gly})_q$ , en la que los subíndices  $p$  y  $q$  son cada uno, independientemente, un número entero de 0 a 20; o un dominio peptídico TAT de VIH cargado positivamente; y al menos dos miembros seleccionados del grupo que consiste en:

i) una primera cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de restos de formación de imágenes unidos;

ii) una segunda cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes de dirección unidos; y

iii) una tercera cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes terapéuticos o agentes cosmeceúticos unidos seleccionados del grupo que consiste en toxina botulínica, EGF, TGF- $\beta$ 1, insulina, VEGF, un bloqueante de VEGF y anticuerpos contra VEGF;

con un vehículo farmacéuticamente aceptable para formar un complejo de asociación no covalente que tiene una carga neta positiva, con la condición de que al menos uno de dichos dos miembros de los grupos (i) a (iii) se seleccione del grupo i) o grupo iii).

22. Un kit para formular una composición de liberación farmacéutica, comprendiendo dicho kit un componente de cadena principal polimérica cargada positivamente que tiene unida covalentemente al mismo una pluralidad de secuencias de aminoácidos cargadas positivamente seleccionadas de entre  $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ , en la que  $n1$  es un número entero de 0 a 20 y  $n2$  es un número entero impar de 5 a 25;  $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRRQRRR}-(\text{gly})_q$ ; o  $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRRQRRR}-(\text{gly})_q$ , en la que los subíndices  $p$  y  $q$  son cada uno, independientemente, un número entero de 0 a 20; o un dominio peptídico TAT de VIH cargado positivamente; y al menos dos miembros seleccionados del grupo que consiste en:

- i) una primera cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de restos de formación de imágenes unidos;
- ii) una segunda cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes de dirección unidos; y
- 5     iii) una tercera cadena principal cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes terapéuticos o agentes cosmeceúticos unidos seleccionados del grupo que consiste en toxina botulínica, EGF, TGF- $\beta$ 1, insulina, VEGF, un bloqueante de VEGF y anticuerpos contra VEGF; e instrucciones para preparar dicha composición de liberación farmacéutica.
- 10   23. Una cadena principal cargada positivamente que comprende:
- (a) una cadena polipeptídica lineal cargada positivamente que comprende un polímero de aminoácidos; y
- (b) grupos de ramificación cargados positivamente unidos covalentemente a dicha cadena polipeptídica lineal cargada positivamente, donde dichos grupos de ramificación comprenden
- 15     i)  $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ , donde  $n1$  es un número entero de 0 a 20 y  $n2$  es un número entero impar de aproximadamente 5 a aproximadamente 25; o
- ii) un dominio peptídico TAT de VIH cargado positivamente o al menos un fragmento de TAT de VIH que tiene la secuencia de aminoácidos  $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$  o  $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$ , en la que  $p$  y  $q$  son, independientemente, un número entero de 0 a 20, y la secuencia de aminoácidos del fragmento de TAT de VIH está unida a la cadena polipeptídica lineal cargada positivamente a través del extremo C o el extremo N de la secuencia de aminoácidos.
- 20     24. La cadena principal cargada positivamente de acuerdo con la reivindicación 23, en la que dicha cadena polipeptídica lineal cargada positivamente comprende polilisina que tiene un peso molecular de 70.000 a 300.000.
- 25     25. Una cadena principal cargada positivamente como se define en la reivindicación 23 o 24, que es capaz de asociarse con una cadena principal cargada negativamente que tiene unidos a la misma uno o más agentes biológicos; donde cada uno de dichos agentes biológicos es un agente terapéutico o cosmeceútico seleccionado del grupo que consiste en toxina botulínica, EGF, TGF- $\beta$ 1, insulina, VEGF, un bloqueante de VEGF y anticuerpos contra VEGF, para usarse en un método de liberación del agente biológico a un tejido o una célula.
- 30     26. La cadena principal cargada positivamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, en la que dichos grupos de ramificación unidos a dicha cadena polipeptídica cargada positivamente comprenden el fragmento de TAT de VIH que tiene la secuencia de aminoácidos  $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$ , en la que  $p$  y  $q$  son independientemente un número entero de 0 a 20.
- 35     27. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14, o 15 a 20, en la que la cadena principal polimérica cargada positivamente tiene unidos covalentemente a la misma uno o más grupos de eficacia de secuencia de aminoácidos  $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$ ; en la que  $p$  y  $q$  son cada uno, independientemente, un número entero de 0 a 20.
- 40

**Componentes del sistema de liberación de genes específicos representados en imágenes y de diagnóstico**

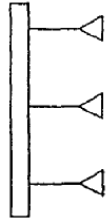
①



**Características:**

- Cadena principal larga cargada positivamente
- Puntos de ramificación
- ● = G3R7, dominios TAT u otros agentes de transfección/dirección endolisosoma/nuclear

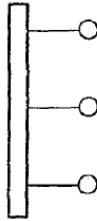
②



**Características:**

- Cadena principal corta cargada negativamente
- Puntos de ramificación o puntos de conjugación
- ▲ = restos para obtener imágenes

③



**Características:**

- Cadena principal corta cargada negativamente
- Puntos de ramificación o puntos de conjugación
- ○ = Agente de dirección selectiva variable (Fab, ligando, etc.)

④



**Características:**

- Oligo o ADNc con transgén de interés

⑤



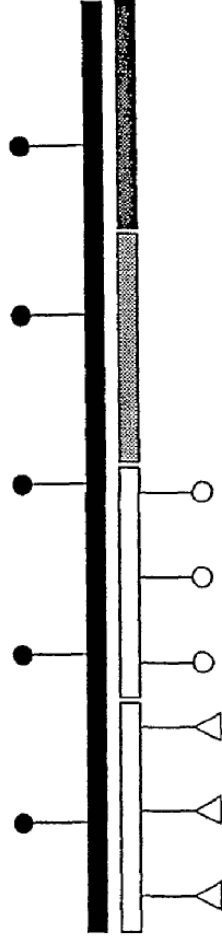
**Características:**

- ADN que codifica factores de persistencia

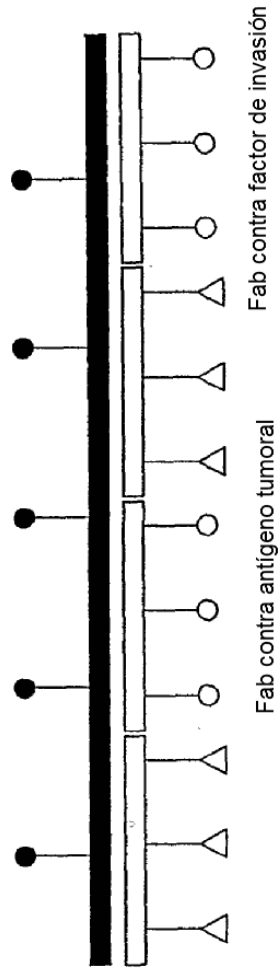
Las combinaciones de componentes anteriores proporcionan mayor especificidad ③, facilitan la obtención de imágenes de diagnóstico ② y mejoran la liberación de genes ④ con alta eficacia ① y persistencia ⑤

# Ejemplos de posibles sistemas de ensamblados

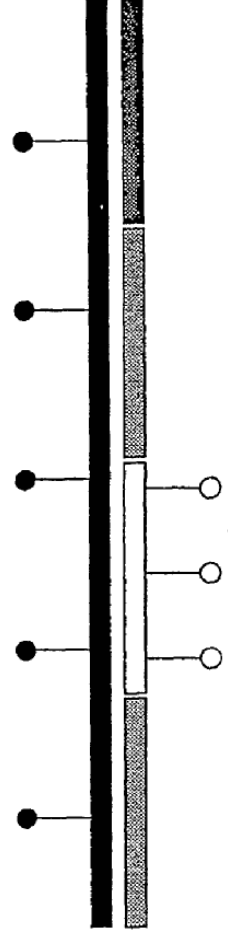
Todas las funciones



Obtención de imágenes de diagnóstico/pronóstico

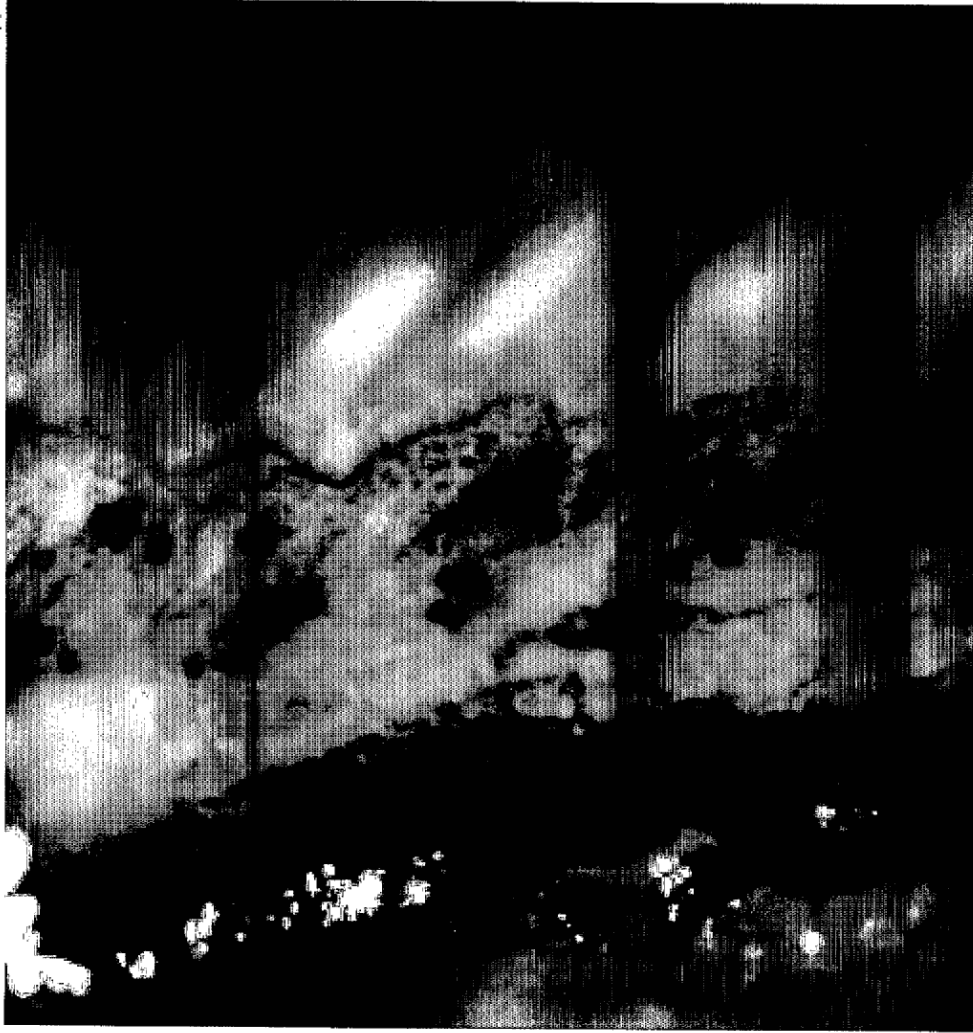


Sistema de dos genes/ sin imágenes para genes relacionados

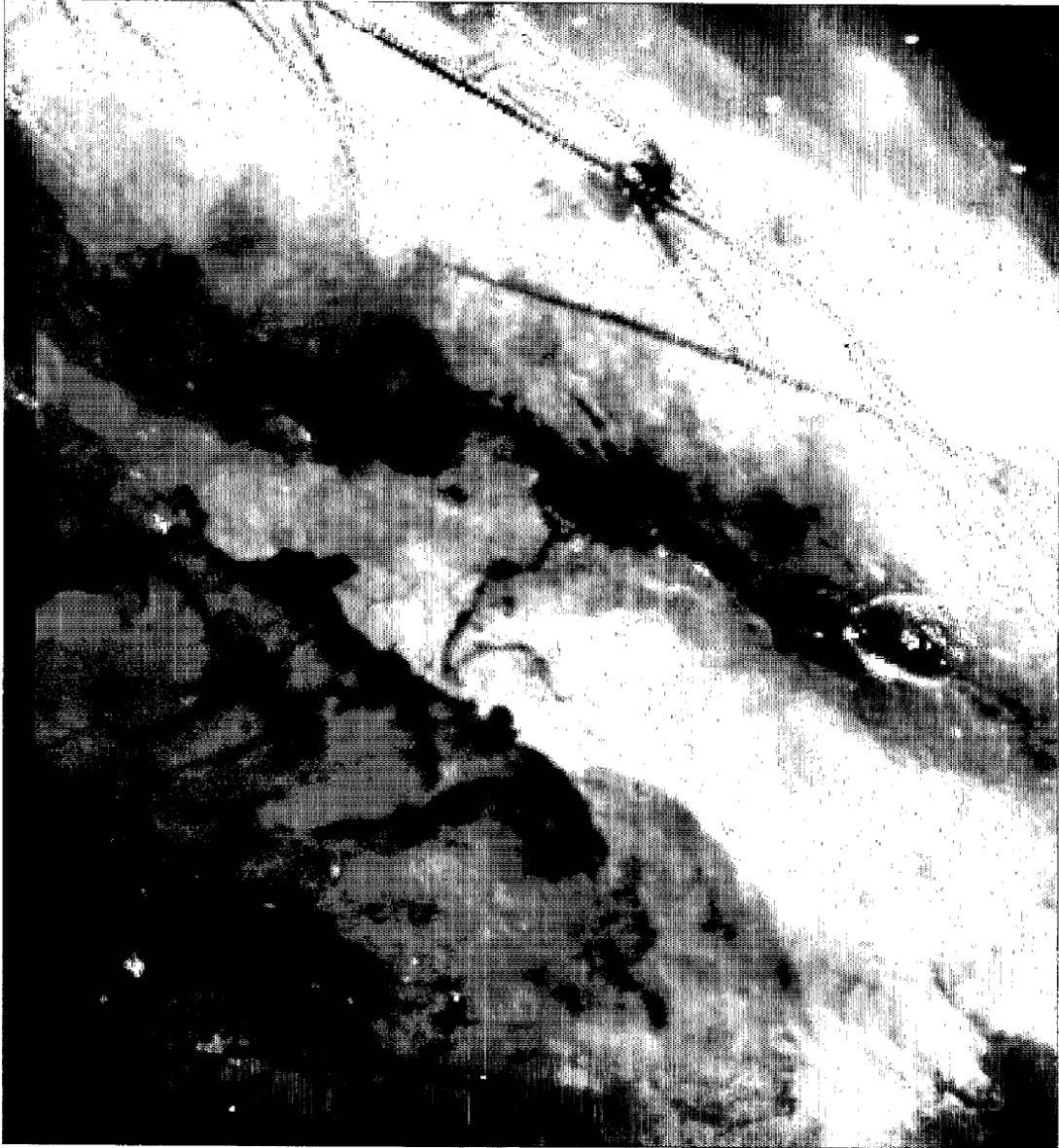




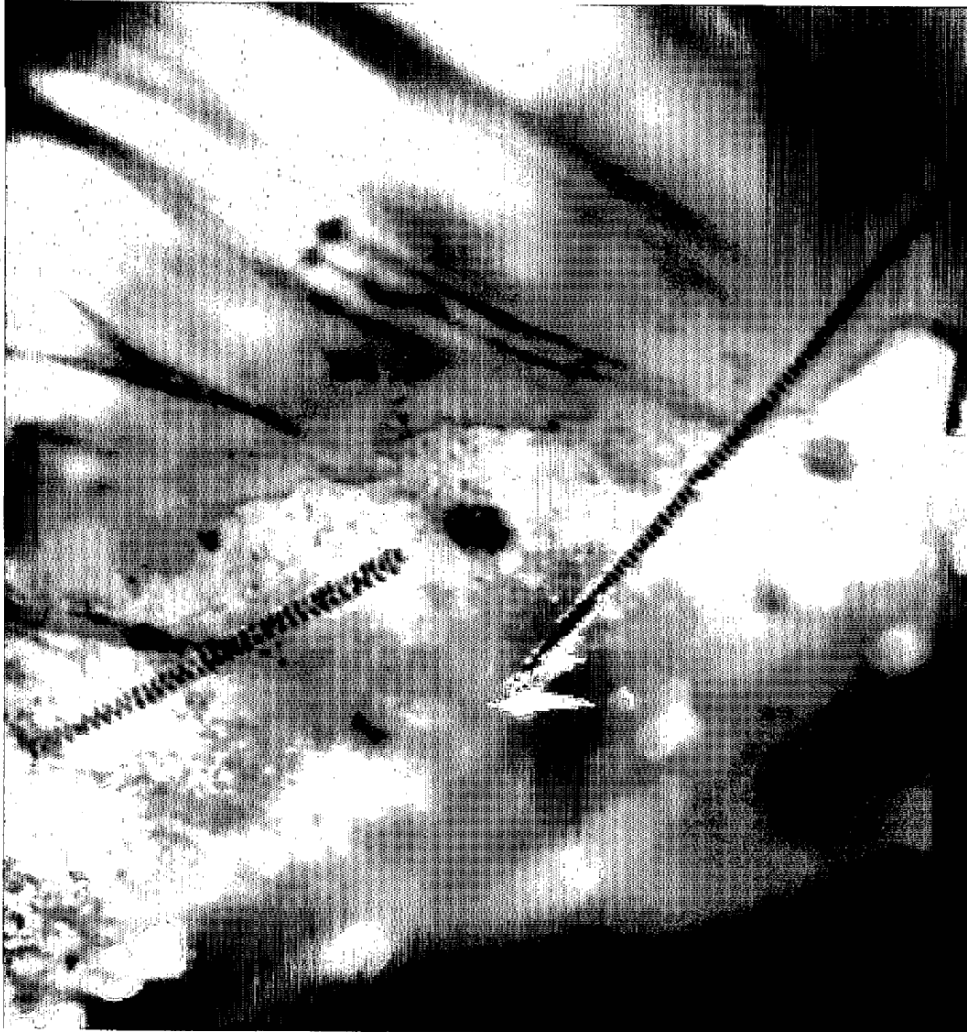
Al



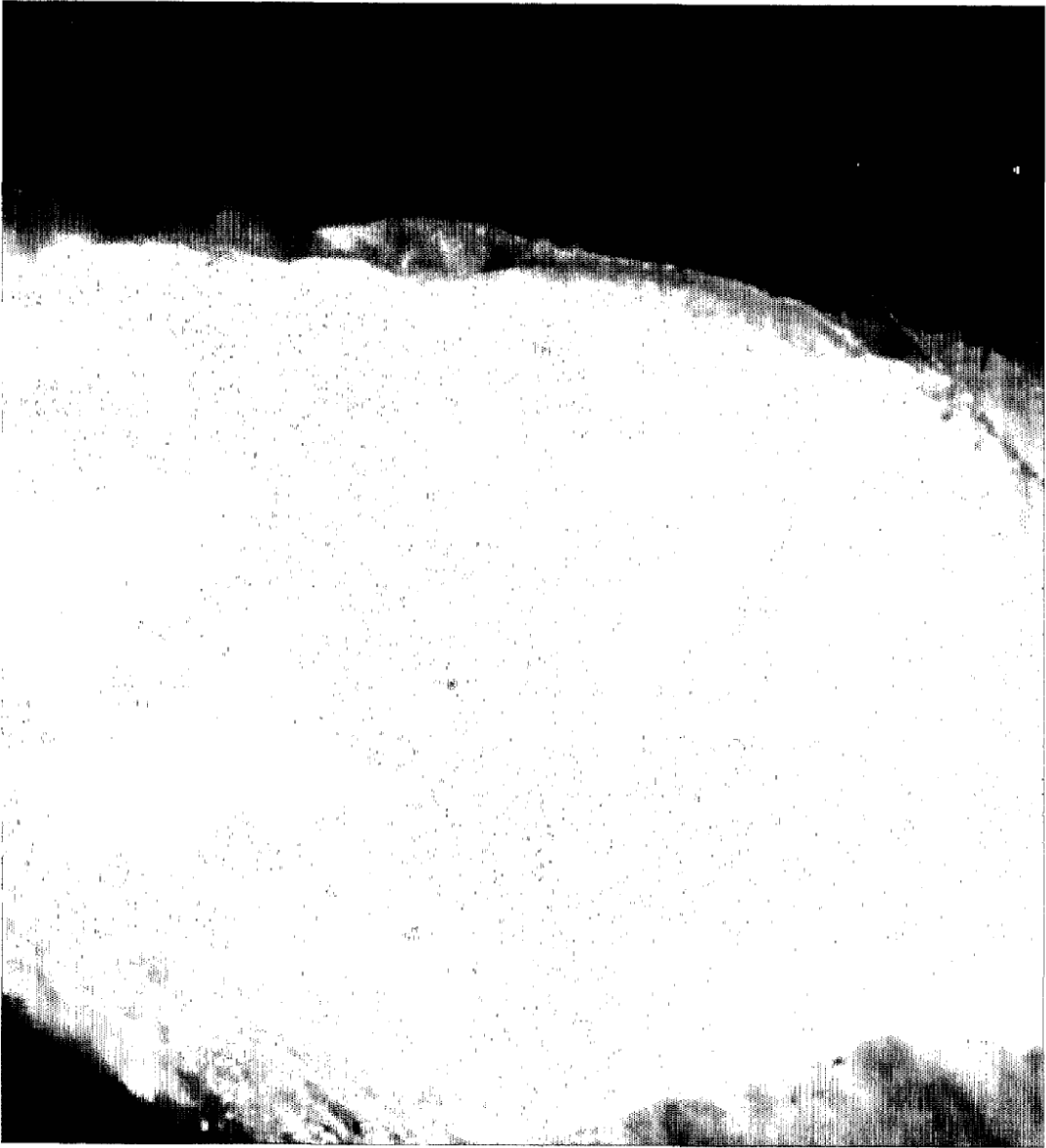
A4



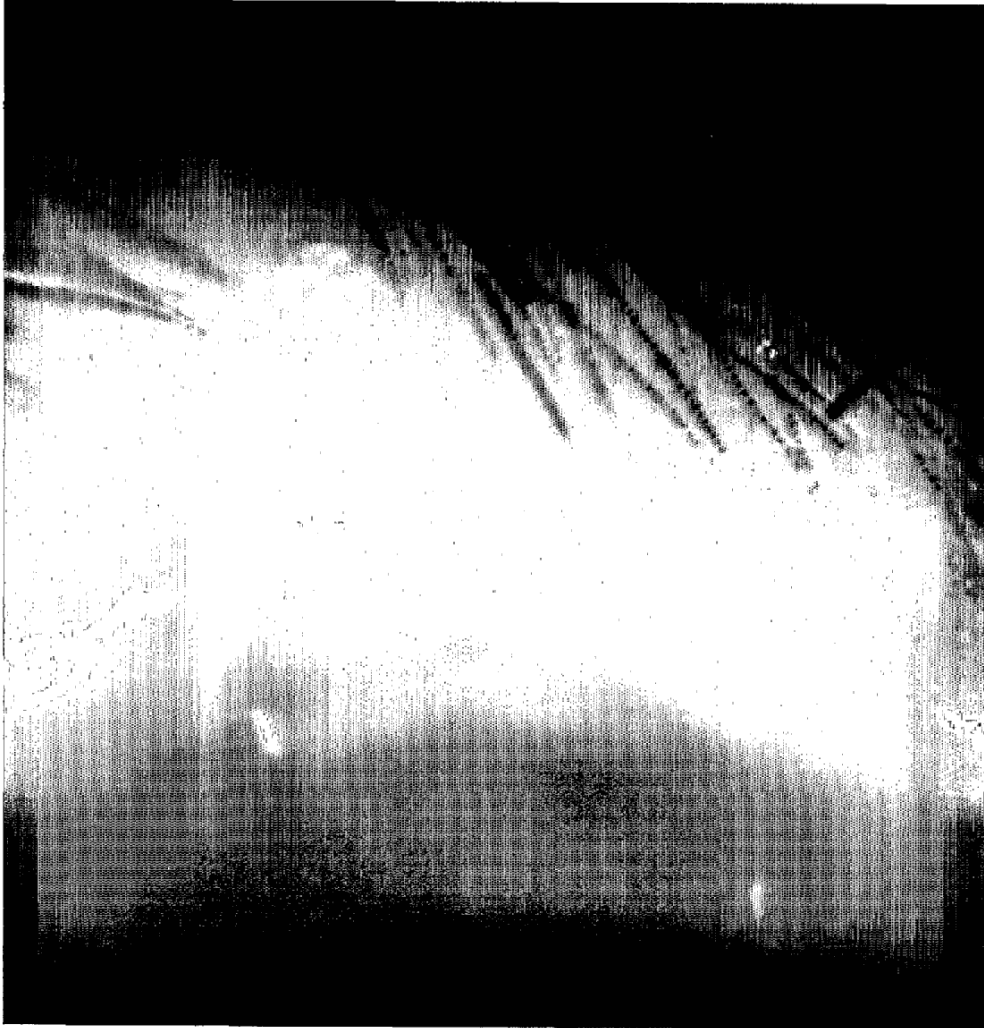
CI



C4



E1



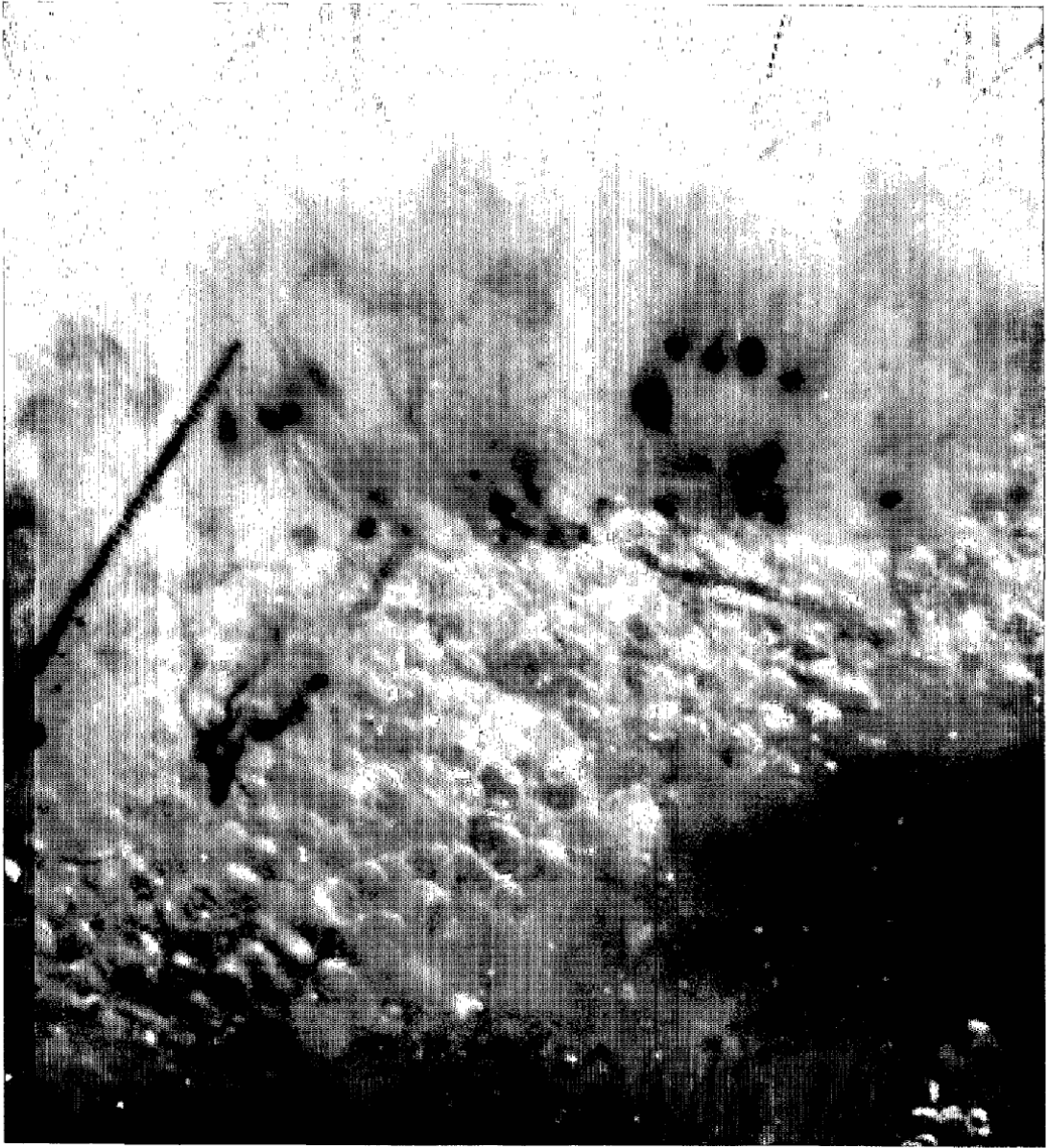
E4



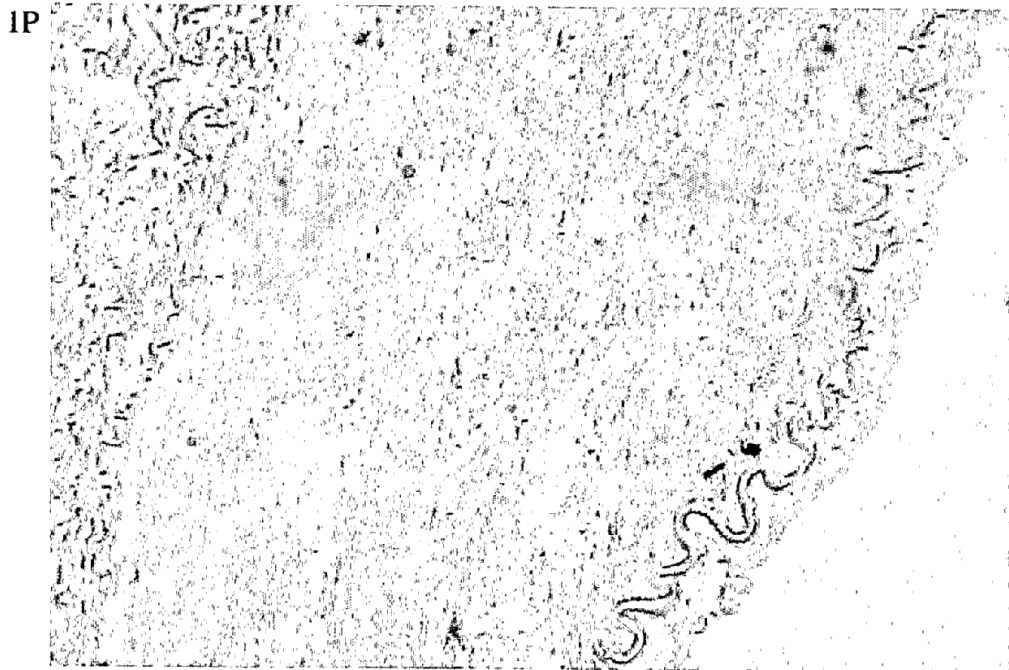
FL



五







2P

