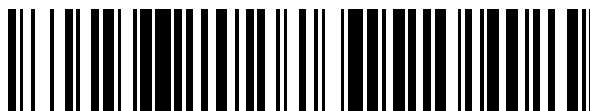


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 760**

51 Int. Cl.:

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

C07K 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.01.2008 PCT/US2008/000805**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2008 WO08091591**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2008 E 08724693 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2124906**

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

30 Prioridad:

22.01.2007 US 886021 P

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

06.11.2017

73 Titular/es:

**ARTIFICIAL CELL TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
5 SCIENCE PARK, SUITE 13
NEW HAVEN, CT 06511, US**

72 Inventor/es:

HAYNIE, DONALD, TEMPLETON

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 640 760 T3

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

DESCRIPCIÓN

Películas de polipéptido y métodos

5 ANTECEDENTES

Las películas de varias capas de polielectrolitos son películas delgadas (por ejemplo con un espesor de unos pocos nanómetros a milímetros) compuestas por capas alternas de polielectrolitos con carga opuesta. Tales películas pueden estar formadas por un montaje de capa por capa sobre un sustrato adecuado. En el automontaje electrostático capa por capa ("ELBL"), la base física de la asociación de polielectrolitos es electrostática. La construcción de la película es posible porque el signo de la densidad de carga superficial de la película se invierte con la deposición de capas sucesivas. En la figura 1 se ilustra el principio general de la deposición ELBL de poliones con carga opuesta. La generalidad y relativa simplicidad del proceso de la película ELBL permite la deposición de muchos diferentes tipos de polielectrolitos sobre muchos diferentes tipos de superficie. Las películas de varias capas de polipéptido son un subconjunto de películas de varias capas de polielectrolitos, que comprenden por lo menos una capa que incluye un polipéptido cargado. Una ventaja importante de las películas de varias capas de polipéptido es su bondad ambiental. Las películas de ELBL pueden ser usadas también para encapsulación. Las aplicaciones de películas y microcápsulas de polipéptido incluyen, por ejemplo, nano-reactores, biosensores, células artificiales, y vehículos para la entrega de fármacos.

Los principios de diseño para incorporación de polipéptidos dentro de películas de varias capas fueron aclarados primero en el documento de EEUU No. 20050069950. Brevemente, la conveniencia de un polipéptido para ELBL está relacionada con la carga neta sobre el polipéptido y la longitud del polipéptido. Un polipéptido adecuado para ELBL comprende preferiblemente uno o más motivos de secuencia de aminoácido, esto es, secuencias contiguas de aminoácidos que tienen una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 residuos de aminoácidos y que tiene una densidad de carga lineal adecuada para la deposición electrostática. Un polipéptido para ELBL puede ser diseñado de diferentes formas, por ejemplo mediante unión uno a otro de una pluralidad de motivos de secuencia de aminoácidos, bien sea directamente, o mediante un agente entrelazador. Los polipéptidos que tienen la longitud y propiedades de carga adecuadas pueden ser depositados fácilmente para formar una o más capas de una película de varias capas de polipéptido.

El documento WO03099835 divulga moléculas poliméricas útiles para procesos de reconocimiento biomolecular, donde dichas moléculas poliméricas comprenden grupos de anclaje mediante los cuales pueden inmovilizarse sobre superficies.

El documento US6020175 divulga películas delgadas funcionales de varias capas fijas sobre un soporte sólido, donde dichas películas comprenden múltiples capas de moléculas funcionales (tales como enzimas y otras proteínas, pigmentos y colorantes) mezcladas con iones de polímero en combinación con varias capas de iones de polímero, sin las moléculas funcionales.

El documento WO0217888 divulga métodos para el control de la permeabilidad de cápsulas de varias capas de polielectrolitos, mediante el ajuste o variación de parámetros tales como pH, temperatura, luz, concentración de sal, composición de iones, concentración de iones, fuerza iónica, composición del solvente o concentración del solvente durante la preparación, almacenamiento y/o uso de las cápsulas o mediante variación del número de capas de polielectrolito y/o composición química, carácter hidrófobo, polaridad, rigidez, peso molecular, la carga o densidad de carga de constituyentes de capa.

El documento WO9947253 divulga un proceso para la preparación de partículas recubiertas y conchas huecas, mediante partículas coloidales de recubrimiento con capas alternas de nanopartículas y polielectrolitos de carga opuesta y opcionalmente retiro de los núcleos coloidales.

Zheng, B., et al, 2005, "Design of peptids for thin films, coatings and microcapsules for applications in biotechnology", Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition, vol. 16(3), 285-299, revisa el estado de la técnica en relación con películas de varias capas a base de polipéptido.

Haynie, D.T. et al, 2006, "Protein-inspired multilayer nanofilms: science, technology and medicine", Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, vol. 2(3) 150-157, también revisa el estado de la técnica en relación con películas de varias capas a base de polipéptido.

Aunque se han aclarado los principios de diseño básico para películas de varias capas de polipéptido, sin embargo permanece una necesidad por el diseño de películas de varias capas de polipéptido que tienen una funcionalidad deseada, en particular funcionalidad biológica.

RESUMEN

En una realización, una película de varias capas comprende dos o más capas de polielectrolitos, en la que las capas adyacentes comprenden polielectrolitos con carga opuesta, en la que un polielectrolito de primera capa comprende un polipéptido de primera capa que incluye uno o más primeros motivos de secuencia de aminoácidos, en el que el uno o más primeros motivos de secuencia de aminoácidos consiste en 5 a 15 aminoácidos y tiene una carga neta por residuo mayor o igual a 0.4. El polipéptido de primera capa tiene una longitud de por lo menos 15 aminoácidos, y tiene un balance de carga a pH 7 mayor a o igual a aproximadamente un medio de la longitud total del polipéptido de primera capa; en el que el polipéptido de primera capa comprende un agente terapéutico unido de manera covalente en forma reversible al extremo N o al extremo C del polipéptido de primera capa. Una segunda capa comprende un polielectrolito de segunda capa que comprende un material policatiónico o un material polianiónico, que tiene un peso molecular mayor a 1,000 y por lo menos 5 cargas por molécula, en el que la segunda capa no comprende un polipéptido.

Un método para liberar de manera controlada un agente terapéutico desde una película de varias capas de polipéptido incluye el suministro de la película de varias capas de polipéptido descrita anteriormente, y el contacto de la película con un estímulo adecuado para estimular la liberación del agente terapéutico a partir del enlace reversible.

En otra realización, un método para ensamblar una película de varias capas de polipéptido comprende la ubicación de un polielectrolito de segunda capa sobre un sustrato, en la que el polielectrolito de segunda capa comprende un material policatiónico o un material polianiónico que tiene un peso molecular mayor a 1,000 y por lo menos 5 cargas por molécula, en el que la segunda capa no comprende un polipéptido; y la colocación de un polipéptido de primera capa sobre el polielectrolito de segunda capa, en el que el polipéptido de primera capa comprende uno o más primeros motivos de secuencia de aminoácidos, en los que el uno o más primeros motivos de secuencia de aminoácidos consiste en 5 a 15 aminoácidos y tiene una carga neta por residuo mayor o igual a 0.4. El polipéptido de primera capa tiene una longitud de por lo menos 15 aminoácidos, y tiene un balance de carga a pH 7 mayor o igual a aproximadamente la mitad de la longitud total del polipéptido de primera capa; y el polipéptido de primera capa comprende un agente terapéutico enlazado de manera covalente de modo reversible al extremo N o al extremo C del polipéptido de primera capa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra de modo esquemático el ensamble de polipéptidos con carga opuesta.

La figura 2 muestra la reacción de DTNB con cadenas laterales de Cys en N1. Un grupo TNB se une a un grupo tiol de péptido por formación de un enlace disulfuro.

La figura 3 muestra el espectro de absorbancia de soluciones LN1 después de diálisis extensiva para retirar el DTNB que no reaccionó, pero antes (0 h) y 1.5 h después de la adición de DTT. El pico a 412 nm en el espectro de 1.5 h se debe a dianiones TNB, mientras a 328 nm (0 h) es debido a disulfuro mixto de tiol-TNB. El agudo aumento de absorbancia por debajo de 300 nm es debido a DTT. El hombro evidente alrededor de 275 nm en momentos posteriores (no mostrado) es debido a DTT oxidado.

La figura 4 muestra la absorbancia (espesor óptico) de película de varias capas a 190 nm v. número de capas.

La figura 5 muestra la disociación de TNB a partir de péptido LN1 en la difusión interior de DTT.

La figura 6 muestra el espectro de absorbancia de medio líquido que rodea los nanorrecubrimientos 10 P1/LN1, registrada 0, 5, 30, o 60 min después de la inmersión en solución 0.1 mM de DTT. La absorbancia de TNB aumenta con el tiempo.

La figura 7 muestra la absorbancia a 412 nm del medio de liberación para películas 10 P1/LN1 v. tiempo de incubación. Las películas "tapadas" tenían (P1/N1)₂ en la superficie exterior. La cinética de liberación de TNB depende del potencial redox y del comportamiento físico presentado por las capas que tapan.

La figura 8 muestra un diagrama esquemático de liberación estimulada por redox de TNB desde nanorecubrimientos de varias capas de polipéptido. Por simplicidad, se han omitido las moléculas de DTT. ΔE significa el cambio en potencial reductor, tiempo Δt .

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los recubrimientos de varias capas de polielectrolito pudieron ser útiles para la entrega de fármaco, por ejemplo desde implantes médicos tales como una cánula endoluminal. En una aproximación, los agentes terapéuticos son cargados dentro del recubrimiento después de la preparación del recubrimiento, y el agente terapéutico es liberado por difusión. En otra aproximación, los agentes terapéuticos son encapsulados dentro de un recubrimiento de varias

capas; nuevamente, la liberación es gobernada por difusión. Una aproximación alternativa, divulgada aquí, es formar un enlace covalente entre el agente terapéutico y el polipéptido de primera capa, donde el enlace covalente es reversible bajo ciertas condiciones fisiológicas por ejemplo, pueden "cargarse" moléculas modelo que portan tiol de 5,5'-ditio-bis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) en polipéptidos 32-mer que contienen Cys, mediante formación de enlace disulfuro, los péptidos "cargados" pueden ser incorporados dentro de una película de varias capas mediante ELBL, y pueden liberarse dianiones 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB) desde la película mediante un cambio en el potencial redox del medio líquido circundante. Tal carga y liberación han sido demostradas experimentalmente.

DTNB, también conocido como reactivo de Ellman, puede ser usado para cuantificar grupos sulfhidrilo libres y disulfuros en péptidos y proteínas. Un aumento en el potencial reductor del medio líquido circundante modela el paso de una partícula recubierta desde el exterior de una célula biológica viva, donde el ambiente es oxidante, al interior, donde es reductor. La aproximación divulgada aquí habilita así la liberación estimulada por el ambiente de un agente terapéutico que está unido de manera covalente a una película de varias capas, mediante un enlace disulfuro, que es sensible al potencial redox local.

En una realización, una película de varias capas comprende dos o más capas de polielectrolitos, en la que las capas adyacentes comprenden polielectrolitos con carga opuesta, en los que un polielectrolito de primera capa comprende un polipéptido de primera capa que comprende una o más primeros motivos de secuencia de aminoácidos, en los que el uno o más primeros motivos de secuencia de aminoácidos consisten en 5 a 15 aminoácidos y tienen una carga neta por residuo mayor a o igual a 0.4, en los que el polipéptido de primera capa no es un homopolímero, tiene una longitud de por lo menos 15 aminoácidos, y tiene un balance de carga a pH 7 mayor o igual a aproximadamente un medio de la longitud total del polipéptido de primera capa; y el polipéptido de primera capa comprende un agente terapéutico enlazado de modo covalente en forma reversible al extremo N o el extremo C del polipéptido de primera capa. Una segunda capa comprende un polielectrolito de segunda capa que comprende un material policatiónico o un material polianiónico que tiene un peso molecular mayor han 1,000 y por lo menos 5 cargas por molécula, en el que la segunda capa no comprende un polipéptido. En una realización en la que la película comprende un sustrato, el polipéptido de primera capa es el más externo, o capa expuesta al solvente, esto es la capa más apartada del sustrato.

También se divulga aquí un método para liberar de manera controlada un agente terapéutico desde una película de varias capas de polipéptido, que comprende el suministro de la película de varias capas de polipéptido descrita anteriormente, y el contacto de la película con un estímulo adecuado para estimular la liberación del agente terapéutico desde el enlace reversible.

Como se usa aquí, "capa" indica un incremento del espesor, por ejemplo sobre un sustrato por formación de película, a continuación de un paso de adsorción. "De varias capas" indica incrementos múltiples (es decir dos o más) en el espesor. Una "película de varias capas de polielectrolito" es una película que comprende uno o más aumentos de espesor de polielectrolitos. Después de la deposición, las capas de una película de varias capas pueden no permanecer como capas discretas. En efecto, es posible que las especies se entremezclen de manera significativa, en particular en las interfaces de los aumentos de espesor.

El término "polielectrolito" incluye materiales policatiónicos y polianiónicos que tienen un peso molecular mayor a 1,000 y por lo menos 5 cargas por molécula. Los materiales policatiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, poliaminas. Las poliaminas incluyen, por ejemplo, un polipéptido, polivinil amina, poli(aminoestireno), poli(aminoacrilato), poli(N-metil aminoacrilato), poli(N-etilaminoacrilato), poli(N,N-dimetil aminoacrilato), poli(N,N-dietilaminoacrilato), poli(aminometacrilato), poli(N-metil amino- metacrilato), poli(N-etil aminometacrilato), poli(N,N-dimetil aminometacrilato), poli(N,N-dietil aminometacrilato), poli(etilenimina), poli(cloruro de dialil dimetilamonio), poli(cloruro de N,N,N-trimetilaminoacrilato), poli(cloruro de metiacrilamidopropiltrimetilamonio), quitosano y combinaciones que comprenden una o más de los anteriores materiales policatiónicos. Los materiales polianiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, un polipéptido, un ácido nucleico, alginato, carragenina, furcellarano, pectina, xantano, ácido hialurónico, heparina, heparan sulfato, condroitin sulfato, dermatan sulfato, dextran sulfato, ácido poli(met)acrílico, celulosa oxidada, carboximetil celulosa, polisacáridos ácidos, y croscarmelosa, polímeros y copolímeros sintéticos que contienen grupos carboxilo pendientes, y combinaciones que comprenden uno o más de los materiales polianiónicos precedentes.

"Aminoácido" indica un bloque constituyente de un polipéptido. Como se usa aquí, "aminoácido" incluye los 20 aminoácidos L de ocurrencia natural, todos los otros aminoácidos naturales, todos los aminoácidos no naturales y todas las imitaciones de aminoácidos, por ejemplo peptoides.

"Aminoácidos de ocurrencia natural" indica los 20 aminoácidos L que ocurren de modo natural, esto es glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, cisteína, metionina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, arginina, lisina, histidina, fenilalanina, tirosina, triptófano y prolina.

"Aminoácido no natural" indica un aminoácido diferente a cualquiera de los 20 aminoácidos L comunes que ocurren de modo natural. Un aminoácido no natural puede tener estereoquímica L o D.

"Peptoides" o glicina sustituida en N, indica un análogo del correspondiente monómero de aminoácido, con la misma cadena lateral que el aminoácido correspondiente pero con la cadena lateral añadida al átomo de nitrógeno del grupo amino, más que a los carbonos α del residuo. En consecuencia, los enlaces químicos entre los monómeros en un polipeptido no son enlaces de péptido, lo cual puede ser útil para limitar la digestión proteolítica.

5 "Secuencia de aminoácidos" y "secuencia" indica una longitud contigua de cadena de polipéptido que tiene una longitud de por lo menos dos residuos de aminoácido.

10 "Residuo" indica un aminoácido en un polímero u oligómero; es el residuo del monómero de aminoácido a partir del cual se formó el polímero. La síntesis de polipéptido involucra la deshidratación, es decir, se "pierde" una molécula individual de agua por adición de aminoácido a una cadena de polipéptido.

15 "Motivo de secuencia de aminoácidos" indica una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende n residuos, en la que n es 5 a 15. De acuerdo con la invención, la magnitud de la carga neta por residuo de un motivo de secuencia de aminoácido es mayor a o igual a 0.4. En otra realización, la magnitud de la carga neta por residuo de un motivo de secuencia de aminoácido es mayor a o igual a 0.5. Como se usa aquí, la magnitud de la carga neta se refiere al valor absoluto de la carga neta, esto es, la carga neta puede ser positiva o negativa.

20 "Polipéptido diseñado" indica un polipéptido que comprende uno o más motivos de secuencia de aminoácido, en el que el polipéptido tiene una longitud de por lo menos 15 aminoácidos y la relación del número de residuos cargados de la misma polaridad menos el número de residuos de la polaridad opuesta, al número total de residuos en el polipéptido es mayor a o igual a 0.4 a pH 7.0. En otras palabras, la magnitud de la carga neta por residuo del polipéptido es mayor a o igual a 0.4. En una realización, la relación del número de residuos cargados de la misma polaridad menos el número de residuos de la polaridad opuesta al número total de residuos en el polipéptido es mayor a o igual a 0.5 a pH 7.0. En otras palabras, la magnitud de la carga neta por residuo del polipéptido es mayor a o igual a 0.5. Mientras no hay límite superior absoluto en la longitud del polipéptido, en general, los polipéptidos diseñados adecuados para deposición ELBL tienen un límite de longitud superior práctico de 1,000 residuos.

30 "Estructura primaria" indica la secuencia lineal contigua de aminoácidos en una cadena de polipéptido, y "estructura secundaria" indica los tipos de estructura más o menos regulares en una cadena de polipéptido, estabilizados mediante interacciones no covalentes, usualmente enlaces de hidrógeno. Ejemplos de estructura secundaria incluyen hélice α , lámina β , y giro β .

35 "Película de varias capas de polipéptido" indica una película que comprende uno o más polipéptidos tales como los polipéptidos diseñados definidos anteriormente. Por ejemplo, una película de varias capas de polipéptido comprende una primera capa que comprende un polipéptido diseñado y una segunda capa que comprende un polielectrolito tiene una carga neta de polaridad opuesta a la del polipéptido diseñado. Por ejemplo, si la primera capa tiene una carga neta positiva, la segunda capa tiene una carga neta negativa; y si la primera capa tiene una carga neta negativa, la segunda capa tiene una carga neta positiva. La segunda capa comprende otro polipéptido diseñado u otro polielectrolito.

40 "Sustrato" indica un material sólido con una superficie adecuada para adsorción de polielectrolitos desde solución acuosa. La superficie de un sustrato puede tener esencialmente cualquier forma, por ejemplo plana, esférica, de barra y similares. Las superficies de los sustratos son regulares o irregulares. Un sustrato puede ser un cristal. Un sustrato incluye opcionalmente moléculas bioactivas. El tamaño de los sustratos varía desde la nanoescala hasta la macroescala. Además, un sustrato comprende opcionalmente varias subpartículas pequeñas. Un sustrato puede ser hecho de material orgánico, material inorgánico, material bioactivo, o una combinación de ellos. Ejemplos no limitantes de sustratos incluyen obleas de silicio; partículas coloidales cargadas, por ejemplo micropartículas de CaCO_3 o de melamina formaldehído; cristales de proteína; cristales de ácido nucleico; células biológicas tales como eritrocitos, hepatocitos, células bacterianas, células de levadura; látex de polímeros orgánicos, por ejemplo látex de poliestireno o de copolímero de estireno; liposomas; organelos; y virus. En una realización, un sustrato es un dispositivo médico tal como un marcapasos, un implante coclear o una cánula endoluminal.

55 Cuando un sustrato se desintegra o es retirado de otro modo durante o después de la formación de la película, es llamado "un patrón" (para formación de película). Las partículas de patrón pueden disolverse en solventes apropiados o ser retiradas mediante tratamiento térmico. Si, por ejemplo, se usan partículas de patrón de melamina formaldehído parcialmente entrecruzadas, el patrón puede ser desintegrado mediante métodos químicos suaves, por ejemplo en DMSO, o mediante un cambio en el valor de pH. Después de la disolución de las partículas de patrón, quedan conchas huecas de varias capas que están compuestas de capas alternantes de polielectrolitos.

60 Una "microcápsula" es una película de polielectrolito en forma de una concha hueca o una cobertura que rodea un núcleo. El núcleo comprende una variedad de diferentes materiales que encapsulan, tales como una proteína, un fármaco o una combinación de ellos, en forma líquida o cristalina, por ejemplo.

65 "Molécula bioactiva" indica una molécula, macromolécula o ensamble macromolecular que tiene un efecto biológico. El efecto biológico específico puede ser medido en un ensayo adecuado y normalizado por unidad de peso o por

molécula de la molécula bioactiva. Una molécula bioactiva puede ser encapsulada, retenida detrás de o encapsulada dentro de una película de polielectrolito. Son ejemplos no limitantes de una molécula bioactiva un fármaco, un cristal de un fármaco, una proteína, un fragmento funcional de una proteína, un complejo de proteínas, una lipoproteína, un oligopéptido, un oligonucleótido, un ácido nucleico, un ribosoma, un agente terapéutico activo, un fosfolípido, un polisacárido, un lipopolisacárido. Como se usa aquí, "molécula bioactiva" abarca además estructuras biológicamente activas, tales como, por ejemplo, un fragmento de membrana funcional, una estructura de membrana, un virus, un patógeno, una célula, un agregado de células, y un organelo. Ejemplos de una proteína que puede ser encapsulada o retenida detrás de una película de polipéptido son hemoglobina; enzimas, tales como, por ejemplo glucosa oxidasa, ureasa, lisozima y similares; proteínas de matriz extracelular, por ejemplo, fibronectina, laminina, vitronectina y colágeno; y un anticuerpo. Ejemplos de una célula que puede ser encapsulada o retenida detrás de una película de polielectrolito es una isleta celular trasplantada, una célula eucariota, una célula bacteriana, una célula de planta, y una célula de levadura.

Los agentes terapéuticos son un subconjunto de moléculas bioactivas. "Agente terapéutico" indica un compuesto, elemento o mezcla que cuando es administrado a un paciente, solo o en combinación con otro compuesto, elemento o mezcla, confiere, directa o indirectamente, un efecto fisiológico al paciente. El efecto fisiológico indirecto puede ocurrir a través de un metabolito u otro mecanismo indirecto. Cuando el agente activo es un compuesto, entonces se contemplan aquí sales, solvatos (incluyendo hidratos) del compuesto libre o sal, formas cristalinas, formas no cristalinas, y cualquier polimorfo del compuesto.

Son agentes terapéuticos adecuados las sustancias antiinflamatorias, vasodilatadores coronarios, vasodilatadores cerebrales, vasodilatadores periféricos, agentes contra la infección, psicotrópicos, antimaniacos, estimulantes, antihistamínicos, sedantes gastrointestinales, preparaciones contra la diarrea, fármacos contra la angina, vasodilatadores, antiarrítmicos, fármacos contra la hipertensión, vasoconstrictores, fármacos útiles para tratar migrañas, anticoagulantes y fármacos antitrombóticos, analgésicos, antipiréticos, hipnóticos, sedantes, antieméticos, agentes contra la náusea, anticonvulsivos, fármacos neuromusculares, agentes híper e hipoglicémicos, preparaciones para tiroides y antitiroides, diuréticos, antiespasmódicos, relajantes uterinos, aditivos minerales y nutricionales, fármacos contra la obesidad, fármacos anabólicos, fármacos eritropoyéticos, antiasmáticos, expectorantes, supresores de la tos, mucolíticos, fármacos antiúricémicos, otros fármacos, y combinaciones que comprenden uno o más de los agentes terapéuticos anteriores.

"Biocompatible" indica que no causa efecto adverso sustancial para la salud, por ingestión oral, aplicación tópica, aplicación transdérmica, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inhalación, implante o inyección intravenosa. Por ejemplo, las películas biocompatibles incluyen aquellas que no causan una respuesta inmune sustancial cuando están en contacto con el sistema inmune de, por ejemplo, un ser humano.

"Respuesta inmune" indica la respuesta del sistema inmune celular o humoral a la presencia de una sustancia en cualquier parte del cuerpo. Una respuesta inmune puede caracterizarse por varias vías, por ejemplo, por un incremento en la corriente sanguínea del número de anticuerpos que reconoce un cierto antígeno. Los anticuerpos son proteínas secretadas por las células B, y un antígeno es una entidad que provoca una respuesta inmune. El cuerpo humano combate la infección e inhibe la reinfección aumentando el número anticuerpos en la corriente sanguínea y por doquier. La respuesta inmune específica depende en algo del individuo, aunque la norma son patrones generales de respuesta.

"Epítope" indica la estructura o secuencia de una proteína que es reconocida por un anticuerpo. Normalmente un epítope estará en la superficie de una proteína. Un "epítope continuo" es uno que involucra varios residuos contiguos de aminoácidos, no uno que involucra residuos de aminoácidos que ocurren para estar en contacto o en la región limitada de espacio en una proteína doblada.

Los principios de diseño para polipéptidos adecuados para deposición electrostática capa por capa son aclarados en el documento de EEU No. 2005/0069950. Brevemente, los focos primarios del diseño son la longitud y la carga del polipéptido. La electrostática es el foco de diseño más importante porque es la base de ELBL. Sin propiedades adecuadas de carga, un polipéptido no será sustancialmente soluble en solución acuosa a pH 4 a 10 y no podrá ser usado fácilmente para la fabricación de una película de varias capas por ELBL. Otros focos de diseño incluyen la estructura física de los polipéptidos, la estabilidad física de las películas formadas a partir de los polipéptidos, y la biocompatibilidad y bioactividad de las películas y los polipéptidos constituyentes.

Como se definió anteriormente, un polipéptido diseñado indica un polipéptido que comprende uno o más motivos de secuencia de aminoácidos, en el que el polipéptido tiene una longitud de por lo menos 15 residuos de aminoácido y la magnitud de la carga neta por residuo del polipéptido es mayor a o igual a 0.4 a pH 7.0. "Motivo de secuencia de aminoácidos" indica una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende n residuos de aminoácido, en el que n es 5 a 15. Los aminoácidos de ocurrencia natural con carga positiva (básicos) a pH 7.0 son Arg, His, y Lys. Los aminoácidos de ocurrencia natural con carga negativa (ácidos) a pH 7.0 son Glu y Asp. Puede emplearse un motivo de aminoácidos que comprende una mezcla de residuos de aminoácidos de carga opuesta, en tanto la relación total de carga satisfaga el criterio especificado. En una realización, un polipéptido diseñado no es un homopolímero.

En una realización a modo de ejemplo, el motivo de secuencia de aminoácidos comprende 7 residuos de aminoácido. Cuatro aminoácidos cargados es un mínimo adecuado para un tamaño de motivo de 7, porque menos de 4 cargas produce como resultado un descenso en la solubilidad del péptido y descenso en el control sobre ELBL. Además, respecto a la biocompatibilidad, cada motivo de secuencia de aminoácidos identificado en los datos genómicos es suficientemente largo con 7 residuos de aminoácido para constituir un epítotope continuo, pero no tan largo como para corresponder sustancialmente a residuos en la superficie de una proteína y en su interior. Así, la carga y longitud del motivo de secuencia de aminoácidos ayudan a asegurar que un motivo de secuencia de aminoácidos identificado en datos genómicos sea de ocurrencia probable en la superficie de la proteína doblada, a partir de la cual se deriva el motivo de secuencia. En contraste, un motivo muy corto podría parecer al cuerpo ser una secuencia aleatoria, o una no específicamente "auto" y por ello causar una respuesta inmune.

En algunos casos, un foco de diseño respecto a motivos de secuencia de aminoácidos y polipéptidos diseñados, es su propensión a formar estructuras secundarias, notablemente hélice α o lámina β . En algunas realizaciones, es deseable ser capaz de controlar, por ejemplo minimizar, la formación de estructura secundaria por los polipéptidos diseñados, en un medio acuoso con objeto de maximizar el control sobre la formación de película delgada. Primero, se prefiere que los motivos de secuencia sean relativamente cortos, esto es aproximadamente 5 a aproximadamente 15 residuos de aminoácidos, porque los motivos largos tienen mayor probabilidad de adoptar una estructura tridimensional estable en solución. Segundo, un agente entrelazador, tal como un residuo de glicina o prolina, unido de manera covalente entre sucesivos motivos de secuencia de aminoácidos en un polipéptido diseñado reducirá la propensión del polipéptido a adoptar estructura secundaria en solución. Por ejemplo, la glicina tiene una muy baja propensión a la hélice α y una muy baja propensión a la lámina β , haciendo energéticamente muy desfavorable para glicina y sus aminoácidos vecinos formar estructura secundaria regular en solución acuosa. Tercero, la propensión en sí misma a la hélice α y lámina β de los polipéptidos diseñados puede ser minimizada mediante selección de motivos de secuencia de aminoácidos para los cuales la propensión sumada a la hélice α es menor a 7.5 y la propensión sumada a la lámina β es menor a 8. Propensión "sumada" indica la suma de las propensiones a la hélice α o a la lámina β de todos los aminoácidos en un motivo. Los motivos de secuencia de aminoácidos que tienen una ligeramente mayor propensión sumada a la hélice α y/o propensión sumada a la lámina β son adecuados para ELBL, en particular cuando están unidos por agentes entrelazadores tales como Gly o Pro. En ciertas aplicaciones, la propensión de un polipéptido a formar estructuras secundarias puede ser relativamente alta como un rasgo específico de diseño de fabricación de películas delgadas. Las propensiones de estructura secundaria para todos los 20 aminoácidos de ocurrencia natural pueden ser calculadas usando el método de Chou y Fasman (véase P. Chou y G. Fasman, *Biochemistry*, 13:211 (1974)).

Otro foco de diseño en el control de la estabilidad de películas ELBL de polipéptido. Los enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals e interacciones hidrófobas contribuyen a la estabilidad de películas de varias capas. Adicionalmente, los enlaces covalentes de disulfuro formados entre aminoácidos que contienen sulfhidrilo en los polipéptidos dentro de la misma capa o en capas adyacentes pueden incrementar la fortaleza estructural. Los aminoácidos que contienen sulfhidrilo incluyen cisteína y homocisteína. Adicionalmente, puede añadirse un sulfhidrilo a aminoácidos β tales como ácido D,L- β -amino- β -ciloheptil propiónico; ácido D,L-3-aminobutanoico; o ácido 5-(metiltio)-3-aminopentanoico. Los aminoácidos que contienen sulfhidrilo pueden ser usados para "bloquear" (unir juntas) y "desbloquear" capas de un polipéptido de película de varias capas mediante un cambio en el potencial de oxidación. Por consiguiente, la incorporación de un aminoácido que contiene sulfhidrilo en un motivo de secuencia de un polipéptido diseñado habilita el uso de péptidos relativamente cortos en la fabricación de película delgada, en virtud de la formación intermolecular de enlace disulfuro. Los motivos de secuencia de aminoácidos que contienen aminoácidos que tienen sulfhidrilo pueden ser seleccionados de una librería de motivos identificados usando los métodos descritos posteriormente, o diseñados de nuevo.

En una realización, los polipéptidos diseñados que contienen sulfhidrilo, sea sintetizados químicamente o producidos en un organismo huésped, son ensamblados por ELBL en la presencia de un agente reductor para prevenir la formación prematura de enlace disulfuro. A continuación del ensamble de la película, el agente reductor es retirado y se agrega un agente oxidante. En la presencia del agente oxidante, se forman enlaces disulfuro entre grupos sulfhidrilo, "bloqueando" de este modo juntos los polipéptidos dentro de capas y entre capas donde están presentes grupos tiol. Los agentes reductores adecuados incluyen ditiotreitól ("DTT"), 2-mercaptoetanol (2-ME), glutatión reducido, clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), y combinaciones de más de una de estas sustancias químicas. Los agentes oxidantes adecuados incluyen glutatión oxidado, tert-butilhidroperóxido (t-BHP), timerosal, diamida, 5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitro-benzoico) (DTNB), 4,4'-ditiodipiridina, bromato de sodio, peróxido de hidrógeno, tetratiónato de sodio, porfirindina, ortoyodosobenzoato de sodio, y combinaciones de más de una de estas sustancias químicas.

La biocompatibilidad en un foco de diseño en aplicaciones biomédicas. En tales aplicaciones, la información genómica o proteómica es usada como una base para el diseño de polímeros para dar, idealmente, polipéptidos "inertes inmunes". La aproximación será particularmente útil si el objeto fabricado o recubierto hará contacto con la circulación sanguínea. Dado que los motivos de secuencia de aminoácidos son altamente polares, típicamente ocurren sobre la superficie de la forma nativa doblada de la proteína de la cual se derivan. La "superficie" es aquella parte de una proteína doblada que está en contacto con el solvente o es inaccesible al solvente solamente debido a la naturaleza granular del agua. Los motivos de secuencia de aminoácidos identificados en las proteínas sanguíneas

están efectivamente siempre en contacto con células y moléculas del sistema inmune, mientras la proteína está en la sangre. Por ello, los polipéptidos derivados de la superficie de proteínas sanguíneas dobladas tienen menor probabilidad de ser inmunogénicos, que las secuencias seleccionadas al azar. Los polipéptidos diseñados serán generalmente biocompatibles, pero la extensión de la respuesta inmune o cualquier otro tipo de respuesta biológica puede depender bien de detalles específicos de un motivo de secuencia.

La bioactividad puede ser incorporada dentro de una película, recubrimiento o microcápsula por diferentes métodos. Por ejemplo, un polipéptido diseñado que comprende la película puede incluir un dominio funcional. De modo alternativo, la bioactividad puede estar asociada con otra molécula bioactiva encapsulada o recubierta por la película delgada de polipéptido. En una realización, el patrón comprende una molécula bioactiva tal como un cristal de proteína.

En este contexto, un dominio funcional es una región independientemente termoestable de una proteína que tiene biofuncionalidad específica (por ejemplo unión de fosfotirosina). En una proteína de varios dominios, pueden existir dominios con varias funcionalidades, como por ejemplo en la proteína tensina, que abarca un dominio de unión de fosfotirosina y un dominio de proteína de tirosina fosfatasa. La inclusión de un dominio funcional en un polipéptido diseñado incorporado dentro de una película de varias capas puede suministrar la película con una funcionalidad deseada incluyendo, por ejemplo, unión específica de ligando, definición de objetivo in vivo, biodetección, y biocatálisis.

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

En una realización, se diseñan motivos de secuencia de aminoácidos *de novo*. En otras realizaciones, los motivos de secuencia de aminoácidos son seleccionados a partir de la información genómica o proteómica de un organismo específico, tal como el genoma humano. Por ejemplo, la estructura primaria de C3 (gi|68766) de complemento o lactotransferrina (gi|4505043) puede ser usada para buscar motivos de secuencia de aminoácidos en una proteína de sangre humana.

Un método para la identificación de un primer motivo de secuencia de aminoácidos en un polipéptido comprende la selección de un residuo de aminoácido iniciador en el polipéptido; examen de una secuencia de aminoácidos que comprende el residuo de aminoácido iniciador y los siguientes $n-1$ residuos de aminoácido en el polipéptido, respecto a la ocurrencia de cargas positivas y negativas, en el que n es 5 a 15; determinación de los 5-15 residuos de aminoácido como un motivo de secuencia de aminoácidos si la carga neta de las cadenas laterales de los 5-15 residuos de aminoácidos a pH 7 es mayor o igual a $0.4*n$; o descarte de las secuencias si la carga neta de las cadenas laterales de los 5-15 residuos de aminoácidos a pH 7 es inferior a $0.4*n$.

El proceso de búsqueda de datos de secuencia de proteína para un motivo de secuencia de aminoácidos con carga negativa con una longitud n que comprende sólo aminoácidos que son neutros o tienen carga negativa, puede ser descrito como sigue. Primero, se selecciona un primer residuo de aminoácido en una secuencia de proteína. Segundo, se examinan este residuo de aminoácido y los siguientes $n-1$ aminoácidos, respecto a la ocurrencia de arginina (Arg), histidina (His), o lisina (Lys) (los tres aminoácidos que ocurren de manera natural, que a pH neutro puede tener carga positiva), donde n es 5 a 15. Tercero, si se encuentra uno o más residuos de Arg, His, o Lys en estos n residuos de aminoácido, el proceso es iniciado nuevamente en un segundo residuo de aminoácido. Si, sin embargo, no se encuentran Arg, His, o Lys en estos n residuos, se examinan los n residuos para determinar el número de ocurrencias de glutamato (Glu) y/o aspartato (Asp) (los dos aminoácidos con carga negativa a pH neutro). Cuarto, si hay por lo menos $0.4*n$ ocurrencias de Glu y/o Asp en los n residuos, la secuencia es catalogada como un motivo de secuencia de aminoácidos con carga negativa. Si, sin embargo, se encuentran menos de $0.4*n$ ocurrencias de residuos de aminoácidos con carga negativa, se descarta la secuencia que comienza con el primer residuo de aminoácido y se inicia el proceso nuevamente, por ejemplo, en un segundo residuo de aminoácido inmediatamente adyacente al primer residuo de aminoácido. Después de catalogar un motivo, puede iniciarse el proceso nuevamente en un segundo residuo de aminoácido.

El proceso para identificar un motivo de secuencia con carga positiva es análogo a la búsqueda de datos de secuencia de proteína para una secuencia de aminoácidos con una longitud de n residuos, que comprende sólo residuos de aminoácidos que son neutros o tienen carga positiva, y para los cuales la magnitud de la carga neta de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos a pH neutro, es mayor a o igual a $0.4*n$.

También es análogo el proceso para identificar un motivo de secuencia de aminoácidos con carga negativa o un motivo de secuencia de aminoácidos con carga positiva con una longitud n , que permite tanto residuos de aminoácidos con carga positiva como negativa en el motivo. Por ejemplo, un procedimiento para identificar un motivo de secuencia de aminoácidos con carga positiva con una longitud n sería seleccionar un primer residuo de aminoácido en un polipéptido. A continuación, examinar este residuo de aminoácido y los siguientes $n-1$ residuos de aminoácido, respecto a las ocurrencias de residuos que tienen carga positiva o negativa a pH 7. Determinar la carga neta de las n cadenas laterales de residuo de aminoácido. Si el valor absoluto de la carga neta es inferior a $0.4*n$, entonces se descarta la secuencia y se inicia una nueva búsqueda en otro aminoácido, mientras si el valor absoluto de la carga neta es mayor o igual a $0.4*n$, entonces la secuencia es un motivo de secuencia de aminoácidos. El motivo será positivo si la carga neta es mayor a cero y negativo si la carga neta es inferior a cero.

El nuevo diseño de motivos de secuencia de aminoácidos, como se define actualmente, sigue esencialmente reglas similares, excepto que las secuencias no están limitadas a aquellas halladas en la naturaleza. Se eligen una longitud n de motivo y un signo y magnitud deseados de carga neta. Entonces, se seleccionan n aminoácidos para el motivo de secuencia de aminoácidos que da como resultado el signo y magnitud de carga deseados, de modo que el valor absoluto de la carga neta de los n aminoácidos es mayor a o igual a $0.4*n$. Una ventaja potencial del nuevo diseño de un motivo de secuencia de aminoácidos es que el facultativo puede seleccionar de entre todos los aminoácidos (los 20 de ocurrencia natural y todos los aminoácidos no naturales) para alcanzar la carga neta deseada, más que limitarse a los aminoácidos hallados en una secuencia de proteína particular conocida. El grupo más grande de aminoácidos aumenta el intervalo potencial de características físicas, químicas y/o biológicas que pueden ser seleccionadas en el diseño de la secuencia del motivo, comparado para identificación de un motivo de secuencia de aminoácidos en una secuencia genómica.

Un polipéptido diseñado como se define actualmente incluirá uno o más motivo de secuencia de aminoácidos. El mismo motivo puede repetirse, o pueden unirse diferentes motivos en el diseño de un polipéptido para ELBL. En una realización, los motivos de secuencia de aminoácidos están unidos de manera covalente con una secuencia que no interviene. En otra realización, un polipéptido diseñado comprende dos o más motivos de secuencia de aminoácidos unidos de manera covalente por un entrelazador. El entrelazador puede basarse en aminoácidos, por ejemplo uno o más residuos de aminoácidos tales como glicina o prolina, o puede ser cualquier otro compuesto adecuado para unir de manera covalente dos motivos de secuencia de aminoácidos. En una realización, un entrelazador comprende 1-4 residuos de aminoácido, por ejemplo, 1-4 residuos de glicina y/o prolina. El entrelazador comprende una longitud o composición adecuadas de modo que el polipéptido diseñado es mantenido en una magnitud de carga neta por residuo que es mayor a o igual a 0.4.

En una realización, un polipéptido diseñado tiene una longitud mayor a o igual a 15 residuos de aminoácido. En otras realizaciones, un polipéptido diseñado tiene una longitud mayor a 18, 20, 25, 30, 32 o 35 aminoácidos. 1,000 residuos es un límite superior práctico en la longitud de polipéptido.

Una vez los motivos de secuencia de aminoácidos han sido seleccionados o diseñados de nuevo, se sintetiza un polipéptido diseñado con entrelazadores a base de aminoácidos, usando métodos bien conocidos en la técnica, tales como síntesis de fase sólida y química F-moc, o expresión heteróloga en bacterias siguiendo clonación y transformación genética. Los polipéptidos diseñados pueden ser sintetizados mediante una compañía de síntesis de péptidos, por ejemplo, Global Peptid (Ft Collins, Colorado), producidos en el laboratorio usando un sintetizador de péptidos, o producidos mediante métodos de ADN recombinante. Cualquier desarrollo de métodos novedosos para síntesis de péptidos podría mejorar la producción de péptidos pero podría no cambiar fundamentalmente el diseño de péptidos como se describe aquí.

Después de la síntesis, el polipéptido de primera capa es enlazado de modo covalente en forma reversible a un agente terapéutico en el extremo N o el extremo C. Enlace reversible significa que el agente terapéutico es liberado desde el polipéptido de primera capa, por exposición a un estímulo adecuado. El agente terapéutico es unido de modo covalente en forma reversible al extremo N o al extremo C, bien sea como se encuentra en la naturaleza o modificado químicamente para facilitar la unión y liberación. Los enlaces covalentes reversibles pueden ser formados, por ejemplo, entre un fármaco y grupos sulfhidrilo libres, grupos amino libres, y grupos carboxilo libres sobre el polipéptido de primera capa.

En una realización, un grupo alcohol, amina o ácido carboxílico del agente terapéutico está unido de modo covalente en forma reversible al extremo N o al extremo C. La ubicación de la unión depende de la elección del grupo funcional. Por ejemplo si el agente terapéutico es un ácido carboxílico (por ejemplo aspirina) entonces el extremo N del péptido es un punto adecuado de unión. Si el agente terapéutico es una amina (por ejemplo ampicilina), entonces el extremo C es un punto adecuado de unión, con objeto de lograr un agente activo unido de modo estable al péptido. En ambos ejemplos de los extremos C y N, una unidad monomérica que forma un nuevo enlace péptido en esencia, añade una molécula al extremo del péptido.

Si el agente terapéutico es una amina, un método alterno para unir de modo covalente en forma reversible la amina al extremo C del péptido es permitir que la amina inicie la unión. Si el agente terapéutico es un alcohol, entonces el extremo C o el extremo N son un punto adecuado de unión con objeto de alcanzar una composición estable. Por

ejemplo, cuando el agente terapéutico es un alcohol, el alcohol puede ser convertido en un cloroformiato de alquilo, con fosgeno o trifosgeno. Este producto intermedio reacciona entonces con el extremo N del péptido para producir una composición de agente terapéutico péptido unido vía un carbamato. El agente terapéutico de carbamato puede ser liberado entonces del péptido mediante peptidasas, amidasas, o esterases intestinales.

De modo alternativo, un agente terapéutico de alcohol puede unirse de manera selectiva al carboxilato gamma de ácido glutámico y entonces este conjugado unirse de manera covalente al extremo C del péptido. Dado que el conjugado de ácido glutámico-agente terapéutico puede ser considerado un dímero, éste producto añade dos unidades monoméricas al extremo C del péptido donde el fragmento de ácido glutámico sirve como un espaciador entre el péptido y el agente terapéutico. La hidrólisis enzimática intestinal del enlace del péptido clave libera el fragmento ácido glutámico-fármaco del vehículo de péptido. La amina libre formada recientemente del residuo de ácido glutámico soportará entonces una reacción intramolecular de transaminación, liberando así el agente terapéutico con formación coincidente de ácido prioglutámico.

Si el agente terapéutico es una cetona o un aldehído, entonces se forma un cetal con un agente de unión que tiene un grupo pendiente adecuado para unirse al extremo N o al extremo C. Por ejemplo, puede formarse un cetal por la reacción de metiltribofuranósido o glucosa con metilnaltrexona como se muestra en el ejemplo de reacción de glucosa con metilnaltrexona. El hidroxilo remanente libre del fragmento de azúcar puede entonces ser tratado como un alcohol para unirse al extremo C.

En una realización, el agente terapéutico es unido de manera covalente en forma reversible al extremo N del péptido. Los aminoácidos adecuados para unión incluyen ácido glutámico, ácido aspártico, serina, y lisina, por ejemplo. Típicamente, los fármacos adecuados para unirse al extremo N suministran un grupo ácido carboxílico o un grupo funcional inorgánico, para conjugación tal como por ejemplo, ibuprofeno, furosemida, gemfibrozil, y naproxeno.

En una realización, el agente terapéutico es unido de manera covalente en forma reversible al extremo C del péptido. La unión al extremo C de un agente terapéutico a un péptido puede ser formada a través de una pluralidad de grupos funcionales de agente activo. Los grupos funcionales incluyen aminas y sus equivalentes y alcoholes y sus equivalentes. Mientras puede usarse cualquier aminoácido para conectar el agente activo al extremo C, el ácido glutámico, ácido aspártico, serina y lisina son aminoácidos particularmente adecuados. Los agentes activos adecuados para unirse al extremo C son agentes activos con grupos funcionales alcohol y amino tales como por ejemplo, atenolol, metropolol, propanolol, metilfenidato y sertralina.

En una realización, un agente terapéutico puede estar unido también de modo covalente a las cadenas laterales del polipéptido. Un agente activo que contiene ácido carboxílico puede estar unido al grupo amina o alcohol de la cadena lateral de péptido para formar una amida o un éster, respectivamente. Un agente activo que contiene amina puede estar unido al grupo carboxilato, carbamida o guanina de la cadena lateral para formar una amida o un nuevo grupo guanina. Adicionalmente, pueden seleccionarse agentes de enlace de entre el grupo de todas las clases químicas de compuestos, tal que pueda unirse virtualmente cualquier cadena lateral del péptido.

En otra realización, la unión covalente reversible del agente terapéutico al extremo N o al extremo C del péptido es realizada mediante la incorporación de un agente de enlace entre el agente activo y el péptido. El agente de enlace debería tener un grupo funcional pendiente, tal como carboxilato, un alcohol, tiol, oxima, hidrazona, hidrazida, o un grupo amino, para unirse de manera covalente al extremo N o extremo C del péptido. En una realización, el agente terapéutico es un alcohol y el grupo alcohol está unido de manera covalente al extremo N del péptido a través de un agente de enlace. En otra realización, el agente terapéutico es una cetona o un aldehído, que está unido a un agente de enlace a través de la formación de un cetal o acetal, respectivamente, y el agente de enlace tiene un grupo pendiente que está unido al péptido. En todavía otra realización, el agente terapéutico es una amina, una imida, un imidazol o una urea donde el nitrógeno está unido al agente de enlace y el grupo pendiente del agente de enlace está unido al péptido.

En una realización, el polipéptido de primera capa y el agente terapéutico comprenden cada uno un grupo sulfhidrilo libre. Los agentes terapéuticos adecuados que comprenden de modo natural grupos sulfhidrilo libres incluyen, por ejemplo, cisteamina, dimercaprol, 2-mercaptoetano sulfonato de sodio, acetilcisteína, omapatrilat, captopril, y similares. Adicionalmente, un agente terapéutico conocido en el cual no está presente grupo sulfhidrilo libre, puede ser modificado mediante métodos químicos para que contenga un grupo sulfhidrilo libre.

La ejecución de hechura de una película de varias capas de polielectrolito comprende el depósito de una pluralidad de capas de polielectrolitos de carga opuesta, sobre un sustrato. Los polielectrolitos depositados de manera sucesiva tienen cargas netas opuestas. En el presente caso, se deposita por lo menos un polielectrolito de primera capa, como se define aquí. La figura 1 es una ilustración esquemática de deposición ELBL. En un ejemplo, la deposición de un polielectrolito tal como un polipéptido diseñado comprende la exposición del sustrato a una solución acuosa que comprende un polipéptido diseñado (u otro polielectrolito) a un pH al cual tiene una carga neta adecuada para ELBL. En otros ejemplos, la deposición de un polipéptido diseñado u otro polielectrolito sobre el sustrato es lograda mediante atomización secuencial de soluciones de polielectrolitos con carga opuesta. En todavía

otros ejemplos, la deposición sobre el sustrato es mediante atomización simultánea de soluciones de polielectrolitos con carga opuesta.

5 En el método ELBL de formación de una película de varias capas, las cargas opuestas de las capas adyacentes suministran la fuerza conductora para el ensamble. No es crítico que los polielectrolitos en capas opuestas tengan la misma densidad lineal de carga neta, sólo que las capas opuestas tengan cargas opuestas. Un procedimiento estándar para ensamble de película para deposición, incluye la formación de soluciones acuosas de los polielectrolitos a un pH al cual están ionizadas (es decir pH 4-10), suministro de un sustrato que porta una carga superficial, e inmersión alterna del sustrato dentro de las soluciones de polielectrolito cargado. Opcionalmente el sustrato es lavado entre la deposición de capas alternas.

10 La concentración de polielectrolito adecuada para deposición del polielectrolito puede ser determinada fácilmente por alguien de destreza ordinaria en la técnica. Un ejemplo de concentración es 0.1 a 10 mg/mL. Típicamente, el espesor de la capa producida es sustancialmente independiente de la concentración de la solución de polielectrolito durante la deposición, en el intervalo establecido. Para polielectrolitos no polipéptidos típicos tales como poli(ácido acrílico) y poli(clorhidrato de alilamina), los espesores de capas son de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 Å, dependiendo de la fuerza iónica de la solución. Los polielectrolitos cortos forman frecuentemente capas más delgadas que los polielectrolitos largos. Respecto al espesor de película, el espesor de película de polielectrolito depende de la humedad así como del número de capas y la composición de la película. Por ejemplo, películas de PLL/PLGA de 50 nm de espesor se encogen hasta 1.6 nm por secado con nitrógeno. En general, pueden formarse películas de 1 nm a 100 nm o más de espesor, dependiendo del estado de hidratación de la película y el peso molecular de los polielectrolitos empleados en el ensamble.

15 Adicionalmente, el número de capas requerido para formar una película estable de varias capas de polielectrolito dependerá de los polielectrolitos en la película. Para películas que comprenden sólo capas de polipéptido de bajo peso molecular, una película tendrá típicamente 4 o más bicapas de polipéptidos con carga opuesta. Para películas que comprenden polielectrolitos de alto peso molecular tales como poli(ácido acrílico) y poli(clorhidrato de alilamina), pueden ser estables las películas que comprenden una bicapa individual de polielectrolito con carga opuesta.

20 En otra realización, un método para la liberación controlada de un agente terapéutico desde una película de varias capas de polipéptido comprende el suministro de una película de varias capas como se describió aquí, y contacto de la película con un estímulo adecuado para estimular la liberación del agente terapéutico desde el enlace reversible, y así desde la película.

25 En una realización, la entrega de agente terapéutico es dirigida a la circulación sistémica general. El ambiente de pH de la corriente sanguínea y/o tracto alimentario pueden suministrar un estímulo adecuado para la liberación del agente terapéutico. En otra realización, el estímulo para liberación del agente terapéutico desde el péptido ocurre mediante acción enzimática sobre el conjugado de péptido-agente terapéutico en la corriente sanguínea o por acción enzimática sobre el conjugado de péptido-agente terapéutico en el tracto alimentario, seguido por absorción a través del intestino o estómago por la ruta regular de entrada.

30 En una realización, el agente terapéutico es unido de manera covalente en forma reversible a través de un residuo de ácido glutámico. El complejo es liberado desde el péptido por hidrólisis del péptido y entonces el agente terapéutico es liberado desde el ácido glutámico mediante transaminación intramolecular coincidente. En otra realización, el ácido glutámico es reemplazado por ácido aspártico, arginina, asparagina, cisteína, lisina, treonina, y serina, y en los que el agente terapéutico está unido a la cadena lateral del aminoácido para formar una amida, un tioéster, un éster, un éter, un tioéter, un carbonato, un anhídrido, un ortoéster, un ácido hidroxámico, una hidrazona, sulfonamida, ésteres sulfónicos, otros derivados de azufre, o un carbamato. En todavía otra realización, el ácido glutámico es reemplazado por un aminoácido sintético con un grupo pendiente que comprende una amina, un alcohol, un sulfhidrilo, una amida, una urea, o una funcionalidad ácida, por ejemplo.

La invención es ilustrada adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

55 Materiales y métodos

60 Materiales: Los péptidos (KVKGKCKV)₃KVKGKCKY ("P1") y (EVEGECEV)₃EVEGECEY ("N1") (Genscript, Inc., EEUU) reciben carga opuesta a pH neutro debido a la adición de un protón a lisina (K) y eliminación de un protón del ácido glutámico (E). Los otros residuos de aminoácidos son valina (V), glicina (G), y Cys (C). Poli(L-lisina) ("PLL") de 4-15 kDa, poli(ácido L glutámico) de 13 kDa ("PLGA"), y DTNB eran de Sigma (EEUU). DL-ditiotreitól (DTT), un agente reductor, era de Gold Biotechnology, Inc. (EEUU). Todos los otros reactivos eran de Sigma. Se disolvieron P1, N1, PLL y PLGA en amortiguador de TA (tris(hidroximetil)aminometano 10 mM, acetato de sodio 10 mM, NaCl 20 mM, NaN₃ 0.1 %, pH 7.4) a una concentración de 1 mg/mL.

65

Etiquetado de N1 con DTNB: los péptidos P1 y N1 contienen residuos de Cys. Un grupo tiol libre en un péptido reaccionará con una molécula de DTNB bajo condiciones oxidantes (Fig. 2). En el proceso, una molécula de TNB forma un disulfuro mixto con una cadena lateral Cys y se libera una molécula TNB a los alrededores. Una solución acuosa de TNB libre es amarilla y tiene un pico de absorbancia a 412 nm a pH suavemente básico. El coeficiente de extinción de TNB varía de 11,400 a 14,150 M⁻¹ cm⁻¹ dependiendo de las condiciones.

Se preparó N1 liofilizado para para cargar mediante disolución de péptido en "amortiguador de TA reductor" (amortiguador de TA, DTT 10 mM, pH 8.1) e incubación a temperatura ambiente por 24 horas. Se introdujeron 2 mL de solución N1 dentro de tubería para diálisis 1,000 MWCO (SpectroPor® 7, Spectrum Laboratories, Inc., EEUU) y se realizó diálisis contra 200 mL de "solución DTNB " (amortiguador de TA, DTNB 10 mM, pH 8.1) con agitación continua. Se cambió la solución de DTNB después de 1, 2, 4, y 17 horas. Se sumergió entonces la bolsa de diálisis que contenía N1 etiquetado (LN1) en amortiguador de TA de pH 7.4 para retirar el exceso de DTNB y para desplazar el pH de 8.1 a 7.4. Se cambió el amortiguador de TA después de 1, 2, 4, y 17 horas. Se ajustó la concentración final de LN1 a 1 mg/mL con amortiguador de TA de pH 7.4. En la Fig. 6 se muestran el espectro de absorbancia UV de LN1 antes y después de tratamiento con DTT.

Ensamble de nanorrecubrimientos de varias capas de polipéptido: se ensamblaron recubrimientos de varias capas de polipéptido sobre portaobjetos de cuarzo para microscopio (Electron Microscopy Sciences, EEUU) después de que los sustratos se limpiaron. Se sumergió de manera repetida un sustrato en una solución de polipéptido con carga positiva (P1 o PLL) y en una solución de polipéptido con carga negativa (N1, LN1, o PLGA) por 15 minutos por paso de adsorción de péptido. Cada paso de deposición de péptido fue seguido por enjuague por 2 minutos, 1 minutos, y 1 minuto del portaobjetos recubierto, en baños separados de agua desionizada. Se ensamblaron de esta forma 30 capas de polipéptido. En algunos casos, como se indica posteriormente, se ensamblaron dos bicapas "para tapar" de P1 y N1, simbolizadas como (P1/N1)₂, encima del recubrimiento de P1/LN1 de 30 capas.

Liberación de TNB de nanorrecubrimientos de varias capas de polipéptido: se diluyó cuatro veces con agua desionizada la solución de LN1 de pH 7.4, y se agregó DTT hasta una concentración final de 2 mM (Fig. 3). Se agitó suavemente la mezcla sobre una plataforma de balanceo a lo largo del proceso de liberación de TNB. Se registraron los espectros de absorbancia de la solución, con un espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240 UV-Vis (Japón). La cobertura cubrió aproximadamente 2 cm² de sustrato en cada caso. El pico de absorbancia de TNB fue llevado al intervalo detectable por inmersión de los recubrimientos P1/LN1 en 10 placas separadas de cuarzo, en 3 mL de medio de liberación (amortiguador de TA de pH 7.4 diluido cuatro veces con agua desionizada; DTT 0, 0.1, o 1 mM). Se registró la absorbancia del medio de liberación mediante barrido espectrofotométrico en instantes definidos. Cada recubrimiento fue sumergido por 5 minutos para la primera medición de absorbancia y 15 minutos para las mediciones subsiguientes. El vaso que contenía la muestra de película y medio de liberación fue agitado suavemente a través del proceso de liberación.

Ejemplo 1: carga de TNB sobre N1.

DTT puede mantener los monotoles completamente en el estado reducido y reducir los disulfuros de manera cuantitativa. El polipéptido N1 fue tratado con DTT para romper posibles enlaces disulfuro inter- e intramoleculares y para protegerlo de grupos tiol libres de cadenas laterales del residuo Cys. Las moléculas N1 resultantes, que tienen varios grupos tiol libres cada una, fueron usadas para carga de TNB en solución suavemente básica (Fig. 2). El pico de absorbancia a 328 nm en Fig. 2, el cual es debido a TNB y disulfuros de mixtos de tiol, muestra que las moléculas de N1 fueron cargadas exitosamente con TNB. La absorbancia de tirosina a 275 nm es más de 10 veces menor a la de TNB en el UV cercano.

Ejemplo 2: ensamble de varias capas de polipéptido.

Se ensamblaron recubrimientos de 30 capas de P1/N1, P1/LN1, P1/PLGA, PLL/N1, y PLL/PLGA sobre portaobjetos de cuarzo mediante LBL. La Fig. 3 presenta la construcción en espesor de película con número de pasos de absorción. P1/N1 mostró la mayor cantidad de material depositado. La diferencia en masa óptica entre P1/N1 y PLL/PLGA sugiere la importancia de la densidad de carga lineal, la secuencia de aminoácidos, y grado de polimerización en la construcción de película de varias capas, consistente con el trabajo previo. Fuertes fuerzas de Coulomb atraerán las especies con carga opuesta y repelerán las de carga similar, limitando el incremento en el espesor de película. El ensamble de P1/LN1 se parece al de PLL/N1 y P1/PLGA. Cada molécula de TNB "cargada" aumentó el carácter hidrófobo del péptido y añadió una carga negativa individual en estos experimentos. Tanto las interacciones electrostáticas como las interacciones hidrófobas influyen en el comportamiento del ensamble de péptido y la estabilidad de la película. La diferencia en el comportamiento de ensamble entre P1/LN1 y P1/N1 es evidencia indirecta de la carga de N1 con TNB, consistente con los datos mostrados en la Fig. 3.

El diseño de polipéptido juega un papel importante en el proceso de carga y liberación del fármaco descrito aquí. Las moléculas de TNB pueden ser cargadas sobre P1 y lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL), y aquel TNB puede ser liberado a partir de moléculas etiquetadas en solución por adición de DTT (datos no mostrados). Pero ni P1 etiquetado ni HEWL etiquetado mostraron ser útiles para el ensamble de película de varias capas mediante LBL (datos no mostrados). P1 y HEWL tienen carga positiva a pH 7.4, mientras los grupos TNB tienen carga negativa. La

combinación de diferentes signos de carga en una molécula individual reducirá el promedio de densidad de carga lineal y la conveniencia para LBL electrostática. La distribución de carga en HEWL es compleja, y algunos de los numerosos grupos hidrófobos presentes forman un "núcleo hidrófobo" en la enzima nativa intacta. En contraste, LN1 es útil para fabricar películas de varias capas mediante LBL electrostática.

5

Ejemplo 3: liberación controlada de TNB.

De modo similar a su comportamiento en solución (Fig. 3), se liberó TNB desde LN1 en recubrimientos de varias capas por inmersión en un ambiente reductor acuoso (Fig. 5). El pico de absorbancia a 412 nm (Fig. 6) muestra el cambio de concentración en TNB como una función del tiempo de incubación del recubrimiento en solución de DTT 0.1 mM. La Fig. 7 compara la cinética de liberación de TNB a partir de recubrimientos con y sin capas de "tapas" de (P1/N1)₂. La constante de tiempo de primer orden para DTT 0.1 mM fue 8 min. Cuanto mayor es la concentración de DTT, mayor es la probabilidad de una colisión de DTT con TNB en el recubrimiento en una cantidad dada de tiempo, y más rápida es la liberación de TNB a partir del recubrimiento. TNB no fue liberado en un nivel detectable bajo condiciones suavemente oxidantes (DTT 0 mM). La concentración de TNB en solución de DTT 0.1 mM después de 1 hora fue 2.2 μM. La adición de bicapas para tapar a los recubrimientos que contenían LN1 redujo la rata de liberación de TNB. La constante de tiempo para películas tapadas fue 19 min, aproximadamente dos veces mayor que para películas no tapadas. Las capas para tapar no contenían TNB; ellas pudieron inhibir por bloqueo la difusión interna de DTT y la difusión externa de TNB, y los grupos tiol libres pudieron ligar TNB y DTT (Fig. 8).

10

15

20

25

TNB ha sido "cargado" sobre polipéptidos diseñados 32-mer que contienen Cys, que tienen carga negativa, los polipéptidos etiquetados han sido usados para ensamblar nanorrecubrimientos de varias capas mediante LBL, y se ha usado un cambio en el potencial redox para estimular la liberación de TNB desde los recubrimientos. La aproximación difiere sustancialmente de la carga de una molécula pequeña dentro de un recubrimiento después de la fabricación del recubrimiento. La aproximación delineada aquí parecería ser un medio más eficiente de atrapar una molécula pequeña, que la carga controlada por difusión, y habilita la liberación estimulada por el ambiente bajo condiciones específicas.

30

El uso de los términos "un" y "uno" y "el" y referentes similares (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) debe ser interpretado como cubriendo el singular y plural, a menos que se indique claramente de otro modo aquí o contradiga claramente el contexto. Como se usan aquí, los términos primero, segundo, etc. no significan la indicación de ningún orden particular, sino simplemente por conveniencia para denotar una pluralidad de, por ejemplo, capas. Los términos "comprende", "tiene", "incluye", y "contiene" deben ser interpretados como términos de extremo abierto (es decir indican "incluye, pero no está limitado a") a menos que se diga de otro modo.

35

40

La declaración de intervalos de valores pretende solamente servir como un método taquigráfico para referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo, a menos que se indique de otro modo aquí, y cada valor separado es incorporado dentro de la especificación como si fuera citado aquí individualmente. Los puntos finales de todos los intervalos están incluidos dentro del intervalo y son combinables de manera independiente. Todos los métodos descritos aquí pueden ser ejecutados en un orden adecuado, a menos que se indique de otro modo aquí o que de otro modo se contradiga claramente con el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o de lenguaje ejemplar (por ejemplo "tal como"), pretende simplemente ilustrar mejor la invención y no impone una limitación al alcance de la invención, a menos que se reivindique de otro modo. Ninguna redacción en el documento debería ser interpretada como indicativa de cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención como se usa aquí.

45

REIVINDICACIONES

1. Una película de varias capas, donde la película comprende dos o más capas de polielectrolitos, en la que las capas adyacentes comprenden polielectrolitos con carga opuesta, en la que un polielectrolito de primera capa comprende un polipéptido de primera capa que comprende uno o más primeros motivos de secuencia de aminoácidos,
- 5 en la que el uno o más primeros motivos de secuencia de aminoácidos consiste en 5 a 15 aminoácidos y tiene una carga neta por residuo mayor o igual a 0.4,
- 10 en la que el polipéptido de primera capa tiene una longitud de por lo menos 15 aminoácidos, y tiene un balance de carga a pH 7 mayor a o igual a aproximadamente un medio de la longitud total del polipéptido de primera capa;
- 15 en la que el polipéptido de primera capa comprende un agente terapéutico que está enlazado de modo covalente en forma reversible al extremo N o al extremo C del polipéptido de primera capa; y
- 20 en la que una segunda capa comprende un polielectrolito de segunda capa que comprende un material policatiónico o un material polianiónico que tiene un peso molecular mayor a 1,000 y por lo menos 5 cargas por molécula, en la que la segunda capa no comprende un polipéptido.
2. La película de varias capas de la reivindicación 1, en la que el polipéptido y el agente terapéutico comprenden grupos sulfhidrilo y el enlace reversible es un enlace disulfuro.
3. La película de varias capas de la reivindicación 1, en la que un grupo alcohol, amina o ácido carboxílico del agente terapéutico está unido de manera covalente en forma reversible al extremo N o al extremo C del polipéptido.
- 25 4. La película de varias capas de la reivindicación 1, en la que la unión del agente terapéutico al péptido es a través de un entrelazador entre el agente activo y el péptido, en el que el entrelazador comprende un grupo funcional pendiente, preferiblemente en el que el grupo funcional pendiente comprende un carboxilato, un alcohol, un tiol, una oxima, una hidrazona, una hidrazida, o un grupo amino.
- 30 5. La película de varias capas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la película está en la forma de una microcápsula.
- 35 6. La película de varias capas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la película está formada sobre un sustrato, preferiblemente en la que el sustrato comprende un dispositivo médico.
7. Un método para liberar de manera controlada un agente terapéutico desde una película de varias capas de polipéptido, que comprende el suministro de la película de varias capas de polipéptido de la reivindicación 1, y el contacto de la película con un estímulo adecuado para estimular la liberación del agente terapéutico del enlace reversible.
- 40 8. El método de la reivindicación 7, en el que
- 45 (i) el enlace reversible es un enlace disulfuro y el estímulo es un agente reductor; o
- (ii) el enlace reversible es una amida, un tioéster, un éster, un éter, un tioéter, un carbonato, un anhídrido, un ortoéster, un ácido hidroxámico, una hidrazona, sulfonamida, ésteres sulfónicos, o un carbamato; y el estímulo es el ambiente de pH de la corriente sanguínea y/o tracto alimentario; o
- 50 (iii) en el que el estímulo es una acción enzimática sobre el enlace polipéptido-agente terapéutico.
9. El método de la reivindicación 7 o reivindicación 8, en el que la película está en la forma de una microcápsula.
- 55 10. El método de la reivindicación 7 o reivindicación 8, en el que la película está formada sobre un sustrato, preferiblemente en el que el sustrato comprende un dispositivo médico.
11. Un método para ensamblar una película de varias capas de polipéptido, que comprende
- 60 colocación de un polielectrolito de segunda capa sobre un sustrato, en el que el polielectrolito de segunda capa comprende un material policatiónico o un material polianiónico que tiene un peso molecular mayor a 1,000 y por lo menos 5 cargas por molécula, en el que la segunda capa no comprende un polipéptido; y disposición de un polipéptido de primera capa sobre el polielectrolito de segunda capa, en la que el polipéptido de primera capa comprende uno o más primeros motivos de secuencia de aminoácidos,
- 65

en el que el uno o más primeros motivos de secuencia de aminoácidos consisten en 5 a 15 aminoácidos y tienen una carga neta por residuo mayor a o igual a 0.4,

5 en el que el polipéptido de primera capa tiene una longitud de por lo menos 15 aminoácidos, y tiene un balance de carga a pH 7 mayor a o igual a aproximadamente un medio de la longitud total del polipéptido de primera capa; y

en el que el polipéptido de primera capa comprende un agente terapéutico enlazado de manera reversible en forma covalente al extremo N o al extremo C del polipéptido de primera capa.

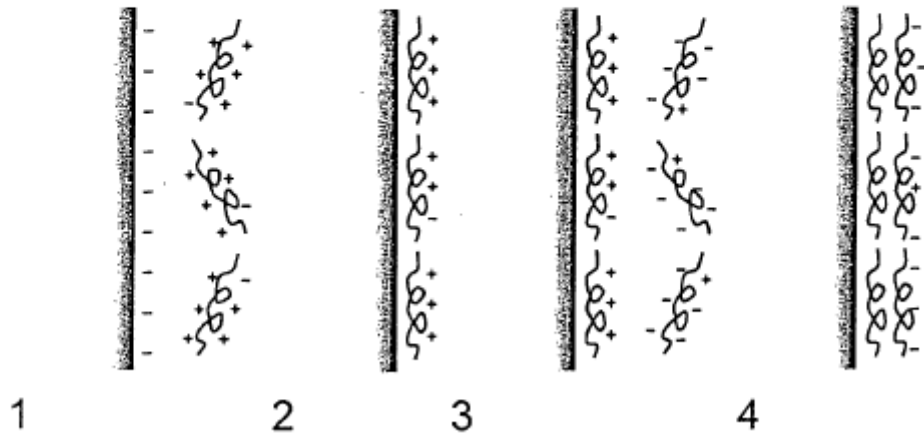
10 12. El método de la reivindicación 11, en el que el polipéptido y el agente terapéutico comprenden grupos sulfhidrilo y el enlace reversible es un enlace disulfuro.

13. El método de la reivindicación 11 o reivindicación 12, en el que el sustrato comprende un dispositivo médico.

15

Figura 1

Automontaje capa por capa (LBL) de películas de varias capas



Película formada sobre un sustrato plano (Recubrimiento)



Película formada sobre una plantilla esférica (Cápsula)

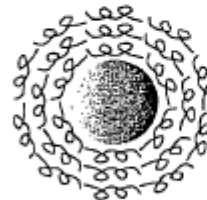


Figura 2

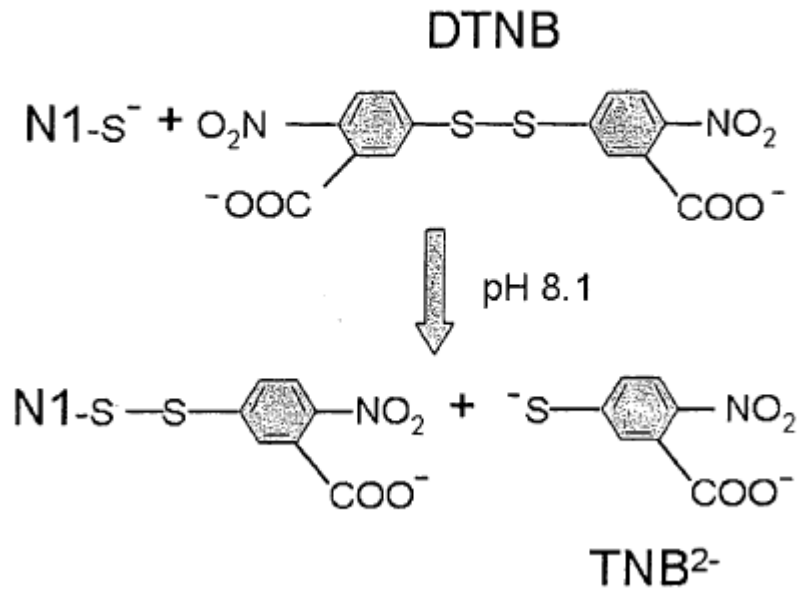


Figura 3

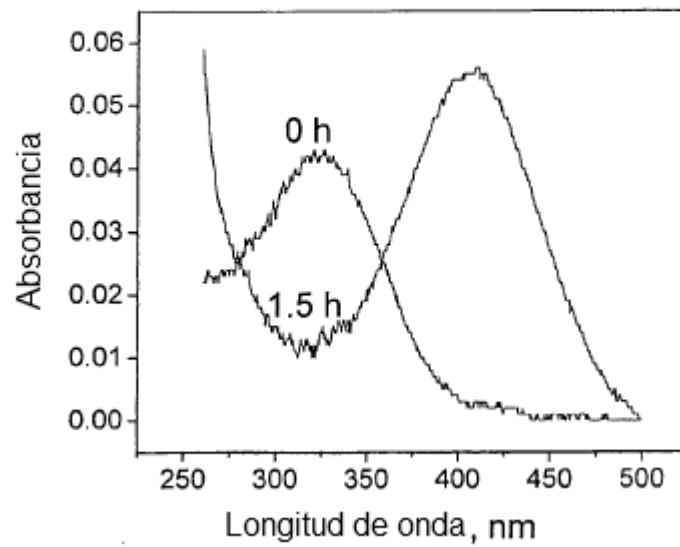


Figura 4

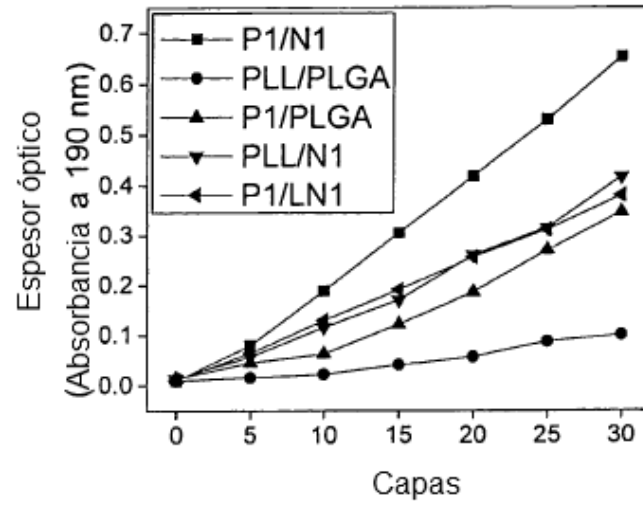


Figura 5

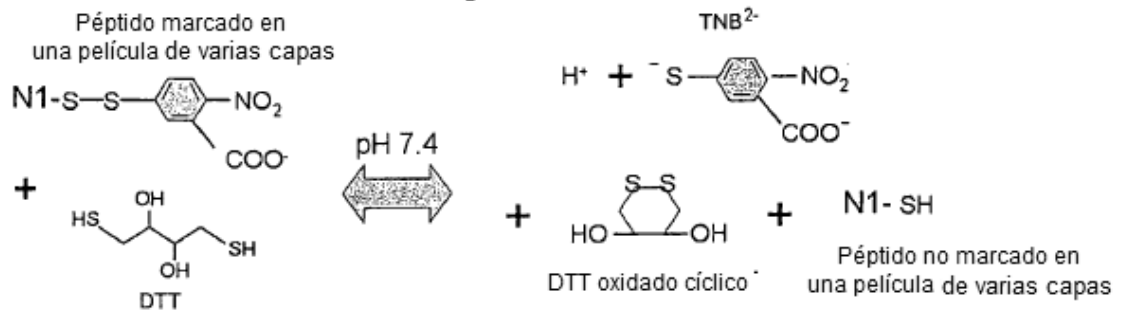


Figura 6

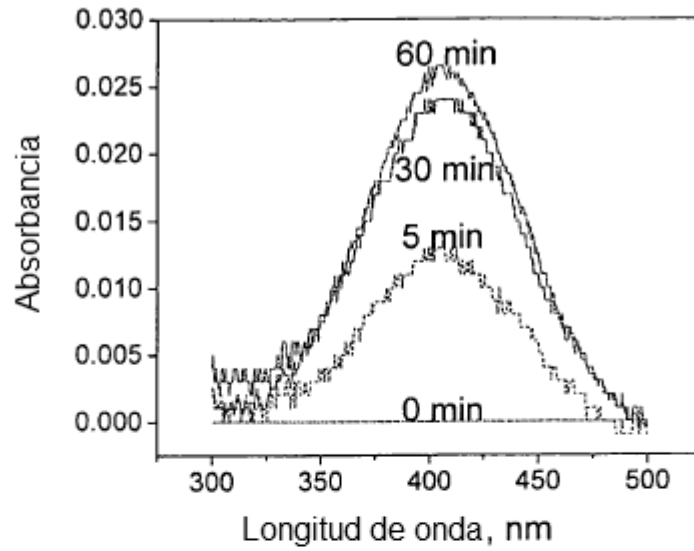


Figura 7

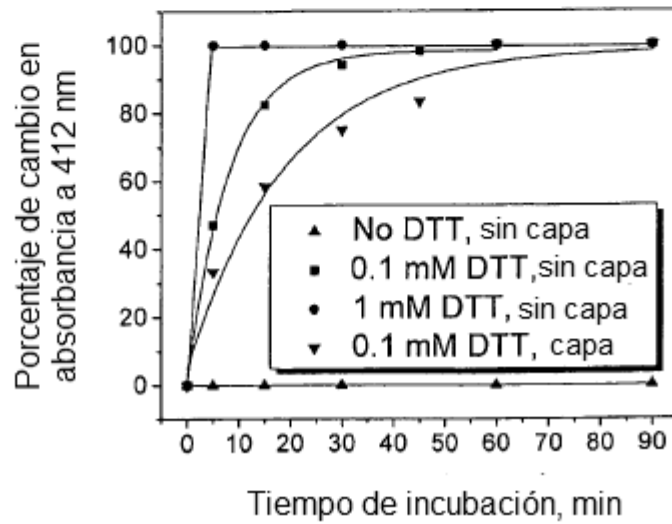


Figura 8

