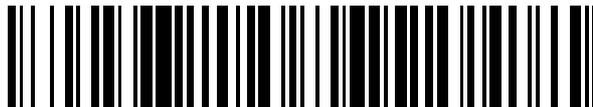


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 350**

51 Int. Cl.:

A61L 27/22	(2006.01)
A61L 27/54	(2006.01)
A61L 31/16	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01)
C07K 19/00	(2006.01)
A61L 31/04	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.03.2009 PCT/US2009/038446**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2009 WO09120893**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2009 E 09724950 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2268673**

54 Título: **Conjugados polipéptido-polímero y procedimientos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

28.03.2008 US 40556

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

26.02.2018

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**HEALY, KEVIN, E.;
WALL, SAMUEL, T.;
SAHA, KRISHANU y
SCHAFFER, DAVID**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 656 350 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

Conjugados polipéptido-polímero y procedimientos de uso de los mismos

5 **Antecedentes**

El uso de anclajes químicos para crear formas en fase sólida de agentes biológicamente activos es un tema recurrente en una amplia gama de aplicaciones médicas y biológicas. Los anclajes químicos se pueden usar para unir péptidos o proteínas bioactivos a superficies, para impartir bioactividad a los implantes porosos o de hidrogel, o en aplicaciones de administración de fármacos. La presentación en fase sólida puede alterar la forma en que las moléculas bioactivas funcionan en un entorno biológico. Mitra et al, Nuclear Medicine and Biology 33 (2006) 43-52, describen conjugados de polímero-péptido para la radioterapia tumoral dirigida a la angiogénesis.

15 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a conjugados de polipéptido-polímero. La presente invención proporciona un conjugado de la fórmula: X-(Y)_n-Z, en la que X es un polipéptido biológicamente activo que tiene un peso molecular de 2 kDa a 2000 kDa, y en la que X es: i) un receptor; o ii) un ligando o un receptor, en la que el ligando activa una ruta de señalización en una célula eucariota; Y es un resto enlazador opcional, en el que n es 0 o un número entero de 1 a 10; y Z es un polímero biocompatible que comprende de 50 a 100.000 subunidades, en el que la relación molar entre el polipéptido biológicamente activo y el polímero es de 10:1 a 50:1; y en el que la CE₅₀ del polipéptido en el conjugado es al menos 2 veces menor que la CE₅₀ del polipéptido en forma soluble. Un conjugado de polipéptido-polímero sujeto es útil en diversas aplicaciones, que también se proporcionan.

25 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 representa un esquema de bioconjugado para injertar una proteína recombinante (Shh, *sonic hedgehog*) en el polímero de ácido hialurónico (HyA).

Las figuras 2A y 2B representan la electroforesis en gel de Shh y sus productos de conjugación con poli(ácido acrílico) (pAAc) (figura 2A) y con HyA (figura 2B).

La Figura 3 representa un esquema de la ruta de transducción de señal de Shh y un mecanismo propuesto para el impacto de la multivalencia de Shh sobre su bioactividad.

La figura 4 representa los resultados de bioactividad de C3H10T1/2 contra Shh soluble (♦, línea gruesa), Shh soluble con HyA soluble (■, líneas discontinuas) y los conjugados Shh-HyA en relaciones estequiométricas de 0.6:1 (Δ), 3.5:1 (O), 7:1 (◇), 14:1 (□) y 22:1 (x).

Las figuras 5A-C presentan un panel de fotomicrografías que representan las reacciones de membrana corioalantoica de pollo (CAM) a muestras de control negativo (Figura 5A), Shh soluble libremente (Figura 5B) y la forma multivalente Shh/HyA 14:1 (Figura 5C).

La figura 6 representa los resultados cuantitativos de la angiogénesis en el ensayo CAM derivado del análisis de imágenes de microfotografía. La figura 7 representa los resultados del modelo numérico de la bioactividad del conjugado Shh-HyA en células C3H10T1/2. El panel superior presenta actividad en función de la concentración de Shh para las relaciones estequiométricas de 1:1-30:1 para un modelo que incorpora interacción estérica. El panel inferior presenta un gráfico de la CE₅₀ frente al nivel de sustitución para dos tipos de modelos frente a los resultados experimentales.

45 **Definiciones**

Los términos "péptido," "polipéptido," y "proteína" se usan indistintamente en este documento y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que puede incluir aminoácidos codificados y no codificados, aminoácidos modificados o derivados química o bioquímicamente y polipéptidos que tienen esqueletos peptídicos modificados. El término "polipéptido" incluye proteínas de fusión, incluyendo, pero sin limitaciones, proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heteróloga, fusiones con secuencias líder heterólogas y homólogas, con o sin restos de metionina en el extremo N; proteínas marcadas inmunológicamente; y similares. El término "polipéptido" incluye polipéptidos que comprenden uno o más de un resto de ácido graso, un resto de lípido, un resto de azúcar y un resto de hidrato de carbono. El término "polipéptidos" incluye polipéptidos modificados postraduccionalmente.

Tal como se usa en el presente documento, el término "copolímero" describe un polímero que contiene más de un tipo de subunidad. El término abarca un polímero que incluye dos, tres, cuatro, cinco o seis tipos de subunidades.

Los términos "sujeto", "individuo", "huésped" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento para un miembro o miembros de cualquier especie de mamífero o no mamífero. Por tanto, los sujetos y pacientes incluyen, sin limitaciones, seres humanos, primates no humanos, caninos, felinos, ungulados (por ejemplo, equinos, bovinos, porcinos (por ejemplo, cerdo)), aves, roedores (por ejemplo, ratas, ratones) y otros sujetos. Modelos de animales no humanos, particularmente mamíferos, por ejemplo, un primate no humano, un murino (por ejemplo, un ratón, una rata), lagomorfos, etc. pueden usarse para investigaciones experimentales.

“Tratar” o “tratamiento” de una afección o enfermedad incluye: (1) prevenir al menos un síntoma de la afección, es decir, hacer que un síntoma clínico no se desarrolle significativamente en un mamífero que pueda estar expuesto o predispuesto a la enfermedad pero que no haya experimentado o mostrado todavía los síntomas de la enfermedad, (2) inhibir la enfermedad, es decir, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o sus síntomas, o (3) aliviar la enfermedad, es decir, producir una regresión de la enfermedad o sus síntomas clínicos.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" significa la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un mamífero u otro sujeto para tratar una enfermedad, es suficiente, en combinación con otro agente, o solo en una o más dosis, para efectuar tal tratamiento para la enfermedad. La "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del compuesto, la enfermedad y su gravedad y la edad, el peso, etc., del sujeto que se va a tratar.

La expresión "forma de dosis unitaria, como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de conjugados de la presente invención calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las formas de dosificación unitaria de la presente invención dependen del compuesto concreto empleado y el efecto que se va a conseguir, y la farmacodinámica asociada con cada compuesto en el huésped.

El término "condiciones fisiológicas" pretende abarcar las condiciones compatibles con células vivas, por ejemplo, condiciones predominantemente acuosas de una temperatura, pH, salinidad, etc. que son compatibles con las células vivas.

Un "excipiente farmacéuticamente aceptable", "diluyente farmacéuticamente aceptable", "vehículo farmacéuticamente aceptable" y "adyuvante farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente, diluyente, vehículo y adyuvante que son útiles para preparar una composición farmacéutica que generalmente son seguros, no tóxicos y no son biológicamente ni de otro modo indeseables, e incluyen un excipiente, diluyente, vehículo y adyuvante que son aceptables para uso veterinario así como para uso farmacéutico. "Un excipiente, diluyente, vehículo y adyuvante farmacéuticamente aceptable" como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones incluye uno y más de uno de dichos excipientes, diluyentes, vehículos y adyuvantes.

Antes de describir adicionalmente la presente invención, ha de comprenderse que la presente invención no se limita a las realizaciones concretas descritas, dado que, por supuesto, pueden variar. Se entenderá también que la terminología usada en el presente documento es para el propósito de describir solo realizaciones particulares y no se desea que sea limitante, dado que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, al décimo de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor declarado o intermedio en el intervalo indicado está comprendido dentro de la invención. Pueden incluirse independientemente los límites superiores e inferiores de estos intervalos más pequeños y también se encuentran incluidos en la presente invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, también se incluyen en la invención los intervalos que excluyan uno cualquiera o ambos de los límites incluidos.

A menos que defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Aunque también pueden usarse en la puesta en práctica o la prueba de la presente invención cualquier método y materiales similares a los descritos en el presente documento, a continuación se describen los métodos y materiales preferentes. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento divulgan y describen los métodos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones.

Cabe destacar que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una," y "el" o "la", incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia "un sustrato sintético" incluye una pluralidad de dichos anticuerpos y la referencia al "polipéptido recombinante" incluye la referencia a uno o más polipéptidos recombinantes y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la materia, y así sucesivamente. Cabe destacar además que las reivindicaciones pueden redactarse de tal modo que excluyan cualquier elemento opcional. Como tales, esta afirmación pretende servir como fundamento para el uso de dicha terminología excluyente tal como "solamente", "solo" y similares en relación con la cita de los elementos de las reivindicaciones o para el uso de una limitación "negativa".

Las publicaciones descritas en el presente documento se proporcionan únicamente por su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. No debe interpretarse que nada en el presente documento constituya una admisión de que la presente invención no tenga derecho a anteponer dicha publicación por virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes a las fechas de

publicación reales, lo que podría necesitar ser confirmado de manera independiente.

Descripción detallada

5 La presente invención se refiere a conjugados de polipéptido-polímero, en los que tales conjugados tienen una estequiometría de unión controlada. La invención proporciona un conjugado de fórmula X-(Y)_n-Z como se define en las reivindicaciones. Un conjugado de polipéptido-polímero sujeto es útil en diversas aplicaciones, que también se proporcionan.

10 La presente descripción también establece una serie de realizaciones como se describe a continuación en el presente documento. No obstante, la invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La actividad biológica de un polipéptido conjugado con el sustrato polimérico se potencia con relación a la actividad del polipéptido en forma soluble, por ejemplo, en comparación con la actividad del polipéptido no conjugado al polímero. En algunas realizaciones, la actividad biológica del polipéptido de un conjugado de polipéptido-polímero sujeto es al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 75 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 200 veces, al menos aproximadamente 500 veces o al menos aproximadamente 1000 veces o más de 1000 veces, mayor que la actividad biológica del polipéptido en forma soluble (no conjugada).

En algunas realizaciones, la actividad biológica del polipéptido de un conjugado de polipéptido-polímero sujeto es al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 75 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 200 veces, al menos aproximadamente 500 veces o al menos aproximadamente 1000 veces o más de 1000 veces, mayor que la actividad biológica del polipéptido cuando se conjuga al polímero a una relación molar de 1:1.

En algunas realizaciones, la actividad biológica del polipéptido de un conjugado de polipéptido-polímero sujeto es al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 75 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 200 veces, al menos aproximadamente 500 veces o al menos aproximadamente 1000 veces o más de 1000 veces, mayor que la actividad biológica del polipéptido cuando está presente en mezcla con el polímero.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la CE₅₀ del polipéptido de un conjugado de polipéptido-polímero sujeto es al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 75 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 200 veces, al menos aproximadamente 500 veces o al menos aproximadamente 1000 veces o más de 1000 veces, menor que la CE₅₀ del polipéptido en forma soluble (forma no conjugada).

Si la actividad biológica del polipéptido de un conjugado de polipéptido-polímero sujeto se incrementa con respecto a la actividad biológica del polipéptido en forma soluble (no conjugada) se determina fácilmente usando uno o más ensayos apropiados para la actividad biológica.

La relación molar entre el polipéptido y el polímero puede variar de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 100:1, por ejemplo, de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 7:1, de aproximadamente 7:1 a aproximadamente 10:1, de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 12:1, de aproximadamente 12:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 15:1 a aproximadamente 20:1, de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 25:1, de aproximadamente 25:1 a aproximadamente 30:1, de aproximadamente 30:1 a aproximadamente 35:1, de aproximadamente 35:1 a aproximadamente 40:1, de aproximadamente 40:1 a aproximadamente 45:1, de aproximadamente 45:1 a aproximadamente 50:1, de aproximadamente 50:1 a aproximadamente 60:1, de aproximadamente 60:1 a aproximadamente 70:1, de aproximadamente 70:1 a aproximadamente 80:1, de aproximadamente 80:1 a aproximadamente 90:1, o de aproximadamente 90:1 a aproximadamente 100:1.

Por ejemplo, cuando un conjugado de polipéptido-polímero sujeto comprende un polipéptido que induce angiogénesis (por ejemplo, el polipéptido es un polipéptido angiogénico), en algunas realizaciones, el polipéptido

angiogénico de un conjugado de polipéptido-polímero sujeto induce al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 75 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 200 veces, al menos aproximadamente 500 veces o al menos aproximadamente 1000 veces o más de 1000 veces, más angiogénesis que el polipéptido angiogénico cuando está presente en mezcla con el polímero, cuando está en forma soluble (no conjugada) o cuando está conjugada al polímero en una relación molar de 1:1.

Polímeros

Los polímeros adecuados a los que se conjuga un polipéptido biológicamente activo incluyen polímeros biocompatibles que comprenden de aproximadamente 50 a aproximadamente 100.000 subunidades, por ejemplo, de aproximadamente 50 subunidades a aproximadamente 100 subunidades, de aproximadamente 100 subunidades a aproximadamente 500 subunidades, de aproximadamente 500 subunidades a aproximadamente 1.000 subunidades, de aproximadamente 1.000 subunidades a aproximadamente 5.000 subunidades, de aproximadamente 5.000 subunidades a aproximadamente 10.000 subunidades, de aproximadamente 10.000 subunidades a aproximadamente 25.000 subunidades, de aproximadamente 25.000 subunidades a aproximadamente 50.000 subunidades, o de aproximadamente 50.000 subunidades a aproximadamente 100.000 subunidades. En algunas realizaciones, el polímero lineal comprende más de 100.000 subunidades.

Todas las subunidades pueden ser idénticas, por ejemplo, el polímero es un homopolímero. En otras realizaciones, está presente más de una especie de subunidad, por ejemplo, el polímero es un heteropolímero o copolímero. En algunas realizaciones, el polímero es un polímero lineal. En otras realizaciones, el polímero puede incluir una o más ramificaciones.

Los polímeros adecuados incluyen polímeros naturales, polímeros semisintéticos y polímeros sintéticos.

Los polímeros naturales adecuados incluyen ácido hialurónico, colágeno, glucosaminoglucanos, celulosa, polisacáridos y similares.

Los polímeros semisintéticos adecuados incluyen, aunque sin limitaciones, colágeno reticulado con aldehídos o precursores de los mismos, ácidos dicarboxílicos o sus halogenuros, diaminas, derivados de celulosa, ácido hialurónico, quitina, chitosano, goma gellan, xantana, pectina o ácido péctico, poliglicanos, polimanano, agar, agarosa, gomas naturales y glicosaminoglucanos.

Los polímeros sintéticos adecuados incluyen, aunque sin limitaciones, polímeros o copolímeros derivados de polidioxano, polifosfaceno, resinas de polisulfona, poli(ácido acrílico), éster de poli(ácido acrílico), poli(etilenglicol), poli(propileno), resinas de poliuretano, poli(ácido metacrílico), éster metílico de poli(ácido metacrílico), éster n-butílico de poli(ácido metacrílico), éster t-butílico de poli(ácido metacrílico), politetrafluoroetileno, poliperfluoropropileno, poli N-vinilcarbazol, poli(metilisopropenilcetona), polialfametilrestireno, polivinilacetato, poli(oximetileno), poli(etileno-co-acetato de vinilo), un poliuretano, un poli(alcohol vinílico) y polietilentereftalato; copolímero de alcohol etilvinílico (habitualmente conocido con el nombre genérico EVOH o con la marca comercial EVAL); polibutylmetacrilato; poli(hidroxiclaurato); poli(ácido L-láctico); policaprolactona; poli(lactida-co-glicólido); poli(hidroxiclaurato); poli(hidroxiclaurato-co-valerato); polidioxanona; poliortoéster; polianhídrido; poli(ácido glicólico) (PGA); poli(ácido D,L-láctico) (PLA); copolímeros de PGA y PLA; poli(ácido glicólico-co-carbonato de trimetileno); polifosfoéster; polifosfoéster uretano; poli(aminoácidos); cianoacrilatos; poli(carbonato de trimetileno); poli(iminocarbonato); copoli(éter-ésteres) (por ejemplo, PEO/PLA); oxalatos de polialquileño; polifosfacenos; poliuretanos; siliconas; poliésteres; poliolefinas; copolímeros de poliisobutileno y etileno-alfaolefina; polímeros y copolímeros acrílicos; polímeros y copolímeros de haluro de vinilo, tales como cloruro de polivinilo; éteres de polivinilo, tales como éter de polivinilmetilo; haluros de polivinilideno, tales como fluoruro de polivinilideno y cloruro de polivinilideno; poliacrilonitrilo; polivinilcetonas; aromáticos de polivinilo, tales como poliestireno; ésteres de polivinilo, tales como acetato de polivinilo; copolímeros de monómeros de vinilo entre sí y olefinas, tales como copolímeros de etileno-metacrilato de metilo, copolímeros de acrilonitrilo-estireno, resinas ABS y copolímeros de etileno-acetato de vinilo; poliamidas, tales como Nylon 66 y policaprolactama; resinas alquídicas; policarbonatos; polioximetilenos; poliimidaz; poliéteres; resinas epoxi; poliuretanos; rayón; rayón-triacetato; celulosa; acetato de celulosa; butirato de celulosa; acetato butirato de celulosa; celofán; nitrato de celulosa; propionato de celulosa; éteres de celulosa; Teflón amorfo; y carboximetilcelulosa.

El polímero al que se conjuga el polipéptido biológicamente activo puede comprender múltiples subunidades seleccionadas entre ácido hialurónico, ácido acrílico, etilenglicol, vinilo, propileno, metacrilato de metilo, ácido metacrílico, acrilamida, metacrilato de hidroxietilo, tetrafluoroetileno, oximetileno, un azúcar (por ejemplo, glucosa, manitol, maltosa, arabinosa, etc.), taurina, betaína, celulosas modificadas, hidroxietilcelulosa, etilcelulosa, metilcelulosa, hidroxietilmetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, almidones modificados, almidón modificado hidrofóticamente, hidroxietilalmidón, hidroxipropilalmidón, amilosa, amilopeptina, almidón

oxidado, un aminoácido y copolímeros de cualquiera de los anteriores. En algunas realizaciones, el polímero no incluye aminoácidos.

5 En algunas realizaciones, el polímero es ácido hialurónico o un derivado de ácido hialurónico. Los derivados de ácido hialurónico incluyen, por ejemplo, un éster de ácido hialurónico en el que parte o la totalidad de las funciones carboxílicas están esterificadas con un alcohol de la serie alifática, aromática, arilalifática, cicloalifática o heterocíclica; un hemiéster de ácido succínico o una sal de metal pesado del hemiéster de ácido succínico con ácido hialurónico o con un éster parcial o total de ácido hialurónico; ácido hialurónico sulfatado o N-sulfatado;

10 Polipéptidos

El componente polipeptídico de un conjugado de polipéptido-polímero sujeto es biológicamente activo, por ejemplo, exhibe una o más actividades biológicas *in vivo* y/o *in vitro*. Las actividades biológicas incluyen, por ejemplo, unión a antígeno; activación de una ruta de señalización en una célula eucariótica; inducción de la proliferación celular; 15 inducción de la diferenciación celular; inducción de angiogénesis; inducción de apoptosis; inducción de angiogénesis; inhibición de la angiogénesis; reducción de la coagulación; reducción de la adhesión celular; mejora de la adhesión celular; control del destino celular; y similares.

20 El componente polipeptídico de un conjugado de polipéptido-polímero sujeto puede ser un polipéptido de origen natural, un polipéptido recombinante o un polipéptido sintético. El polipéptido puede comprender uno o más restos no aminoacídicos, por ejemplo, un resto de lípido, un resto de azúcar, un resto de carbohidrato, etc.

En algunas realizaciones, una sola especie de polipéptido se une a un polímero, por ejemplo, una pluralidad de polipéptidos, que tienen todos la misma secuencia de aminoácidos, se une a un polímero. En otras realizaciones, 25 dos o más especies de polipéptidos están unidos a un polímero, donde un primer polipéptido tiene una primera secuencia de aminoácidos, y un segundo polipéptido tiene una segunda secuencia de aminoácidos que es diferente de la primera secuencia de aminoácidos (por ejemplo, donde la segunda secuencia de aminoácidos tiene de aproximadamente 95 % a aproximadamente 99 %, de aproximadamente 90 % a aproximadamente 95 %, de aproximadamente 85 % a aproximadamente 90 %, de aproximadamente 80% a aproximadamente 85%, de 30 aproximadamente 75% a aproximadamente 80%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 75%, de aproximadamente 65 % a aproximadamente 70 %, o menos del 65 %, de identidad de secuencia de aminoácidos respecto de la primera secuencia de aminoácidos). Por ejemplo, los polipéptidos primero y segundo podrían tener como objetivo diferentes receptores de la superficie celular, por ejemplo, el primer polipéptido podría proporcionar adhesión celular a través de un receptor de integrina y el segundo polipéptido podría proporcionar activación de una 35 célula unida, por ejemplo, mediante receptores del factor de crecimiento, etc. Como otro ejemplo, el primero y el segundo polipéptidos podrían inducir diferenciación celular, por ejemplo, el primero y el segundo polipéptidos podrían inducir miogénesis, el primero y el segundo polipéptidos podrían inducir ambos cardiomiogénesis, el primero y el segundo polipéptidos podrían inducir ambos neurogénesis, el primero y el segundo polipéptidos podrían inducir ambos diferenciación de una célula progenitora en un condrocito, o el primero y el segundo polipéptidos 40 podrían inducir ambos hematopoyesis, en una célula progenitora totipotente, pluripotente o multipotente objetivo.

En algunas realizaciones, el componente polipeptídico de un conjugado de polipéptido-polímero sujeto es recombinante, por ejemplo, el polipéptido incluye uno o más aminoácidos que normalmente no están en enlace de enlace amida con el polipéptido. Por ejemplo, el polipéptido se puede modificar mediante ingeniería para incluir un 45 aminoácido que facilite la unión al componente polimérico del conjugado de polipéptido-polímero. Como ejemplo, el polipéptido puede modificarse mediante ingeniería para incluir un resto de cisteína que facilite la unión al componente polimérico del conjugado de polipéptido-polímero.

El tamaño del polipéptido puede variar de 2 kDa a aproximadamente 2000 kDa, por ejemplo, de aproximadamente 2 50 kDa a aproximadamente 5 kDa, de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa, de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 25 kDa, de aproximadamente 25 kDa a aproximadamente 50 kDa, de aproximadamente 50 kDa a aproximadamente 100 kDa, de aproximadamente 100 kDa a aproximadamente 250 kDa, de aproximadamente 250 kDa a aproximadamente 500 kDa, de aproximadamente 500 kDa a aproximadamente 1000 kDa, de aproximadamente 1000 kDa a aproximadamente 2000 kDa.

55 En algunas realizaciones, el componente polipeptídico de un conjugado de polipéptido-polímero sujeto comprende un marcador detectable. Los marcadores adecuados incluyen, por ejemplo, radioisótopos (por ejemplo, ¹²⁵I, ³⁵S, y similares); enzimas cuyos productos generan una señal detectable (por ejemplo, luciferasa, β-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, y similares); marcadores fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y similares); metales que emiten fluorescencia, por ejemplo, ¹⁵²Eu, u otros de 60 la serie de lantánidos, unidos al anticuerpo a través de grupos quelantes de metales tales como EDTA; compuestos quimioluminiscentes, por ejemplo, luminol, isoluminol, sales de acridinio y similares; compuestos bioluminiscentes, por ejemplo, luciferina; proteínas fluorescentes (por ejemplo, una proteína fluorescente verde, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, etc.); y similares.

65 Los polipéptidos que son de interés para unirse a un polímero, para generar un conjugado de polipéptido-polímero

sujeto incluyen, por ejemplo, factores de crecimiento, receptores, ligandos polipeptídicos para receptores, enzimas, anticuerpos, factores de coagulación, factores anticoagulantes, factores angiogénicos, factores antiangiogénicos, etc. Los polipéptidos adecuados incluyen polipéptidos lineales y polipéptidos cíclicos. Los polipéptidos adecuados incluyen polipéptidos naturales, polipéptidos sintéticos y similares.

5 Los polipéptidos adecuados incluyen, aunque sin limitaciones, un interferón (por ejemplo, IFN- γ , IFN- α , IFN- β , IFN- ω ; IFN- τ); una insulina (por ejemplo, Novolin, Humulin, Humalog, Lantus, Ultralente, etc.); una eritropoyetina ("EPO"; por ejemplo, Procrit®, Eprex®, o Epogen® (epoetina- α); Aranesp® (darbepoietina- α); NeoRecormon®, Epogin® (epoetina- β); y similares); un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, Rituxan® (rituximab); Remicade® (influximab); Herceptin® (trastuzumab); Humira™ (adalimumab); Xolair® (omalizumab); Bexxar® (tositumomab); Raptiva™ (efalizumab); Erbitux™ (cetuximab); y similares), que incluye un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal; un factor sanguíneo (por ejemplo, activador de plasminógeno tisular Activase® (alteplase); NovoSeven® (factor humano recombinante VIIa); Factor VIIa; Factor VIII (por ejemplo, Kogenate®); Factor IX; β -globina; hemoglobina; y similares); factor estimulante de colonias (por ejemplo, Neupogen® (filgrastim; G-CSF); Neulasta (pegfilgrastim); factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos, factor estimulante de colonias de macrófagos, factor estimulante de colonias de megacariocitos; y similares); una hormona de crecimiento (por ejemplo, una somatotropina, por ejemplo, Genotropin®, Nutropin®, Norditropin®, Saizen®, Serostim®, Humatrope®, etc.; una hormona de crecimiento humana; y similares); una interleucina (por ejemplo, IL-1; IL-2, incluyendo, por ejemplo, Proleukin®; IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9; etc.); un factor de crecimiento (por ejemplo, Regranex® (beclapernin; PDGF); Fiblast® (trafermin; bFGF); Stemgen® (ancestim; factor de células madre); factor de crecimiento de queratinocitos; un factor de crecimiento de fibroblastos ácido, un factor de células madre, un factor de crecimiento de fibroblastos básico, un factor de crecimiento de hepatocitos; y similares); un receptor (por ejemplo, un receptor soluble de unión a TNF- α , tal como Enbrel® (etanercept); un receptor de VEGF; un receptor de interleucina; un receptor de linfocitos T $\gamma\delta$ T; y similares); un receptor de neurotransmisores (por ejemplo, un receptor nicotínico de acetilcolina, un receptor de glutamato, un receptor DE GABA, etc.); una enzima (por ejemplo, α -glucosidasa; Cerazyme® (imiglucarasa; β -glucocerebrosidasa, Ceredase® (alglucerasa); un activador enzimático (por ejemplo, activador del plasminógeno tisular); una quimiocina (por ejemplo, IP-10; Mig; Gro α /IL-8, RANTES; MIP-1 α ; MIP-1 β ; MCP-1; PF-4; y similares); un agente angiogénico (por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); un agente anti-angiogénico (por ejemplo, un receptor del VEGF), un péptido neuroactivo, tal como bradiquinina, colecistoquinina, gastina, secretina, oxitocina, hormona liberadora de gonadotropina, beta-endorfina, encefalina, sustancia P, somatostatina, prolactina, galanina, hormona liberadora de gonadotropina, bombesina, dinorfina, neurotensina, motilina, tirotropina, neuropéptido Y, hormona luteinizante, calcitonina, insulina, glucagón, vasopresina, angiotensina II, hormona liberadora de tirotropina, péptido intestinal vasoactivo, un péptido del sueño, etc.; otras proteínas tales como un agente trombolítico, un péptido natriurético auricular, proteína morfogénica ósea, trombopoyetina, relaxina, proteína ácida fibrilar glial, hormona foliculo estimulante, una alfa-1 antitripsina humana, un factor inhibidor de la leucemia, un factor transformante de crecimiento, un factor de crecimiento insulinoide, una hormona luteinizante, un factor activador de macrófagos, factor de necrosis tumoral, un factor quimiotáctico de neutrófilos, un factor de crecimiento nervioso un inhibidor tisular de metaloproteinasas; un péptido intestinal vasoactivo, angiogenina, angiotropina, fibrina; hiruina; un factor inhibidor de la leucemia; un antagonista del receptor de IL-1 (por ejemplo, Kineret® (anakinra)); un canal iónico, por ejemplo, regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR); distrofina; utrofina, un supresor tumoral; enzima lisosomal ácido-glucosidasa (GAA); y similares.

45 Los polipéptidos adecuados incluyen sonic hedgehog (Shh), proteína 4 morfogénica ósea, interleucina-3 (IL-3), factor-1 de células madre (SCF-1), ligando de tirosina cinasa 3 de tipo fms (Flt3), factor inhibidor de la leucemia (LIF), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) y factor de crecimiento epidérmico (EGF). Los polipéptidos adecuados incluyen factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento neural (NGF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4 (NT-4), neurotrofina-5 (NT-5), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y proteasa nexina-1. Los polipéptidos angiogénicos adecuados incluyen un polipéptido netrina-1, un polipéptido del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un polipéptido del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un polipéptido del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y un polipéptido angiopoyetina.

55 Los polipéptidos adecuados también incluyen factores de coagulación, por ejemplo, trombina, etc. Los polipéptidos adecuados también incluyen anticoagulantes. Los polipéptidos adecuados también incluyen polipéptidos de unión a células.

60 Los polipéptidos adecuados también incluyen, por ejemplo, nestina, vimentina, prominina/CD133, sonic hedgehog y otros ligandos de hedgehog, ligandos Wnt, neurocan/tenascina C, Nurr 1, Pax-6, Sox-2, Musashi-1, NG2/CSPG-4, Neuro D3, neurogenina 1 y fragmentos activos y subsecuencias de cualquiera de estos polipéptidos.

65 Los polipéptidos adecuados también incluyen, por ejemplo, β tubulina III, MAP2, enolasa específica de neurona, NCAM, CD24, HAS, sinapsina I, sinaptofisina, CAMK IIA, tirosina hidroxilasa, transportador de glutamato, receptor de glutamato, receptor de colina, nicotínico A2, EphB2, receptor GABA-A, receptor de serotonina (5HT-3), colina acetiltransferasa y fragmentos y subsecuencias de cualquiera de los anteriores.

Los polipéptidos adecuados también incluyen, por ejemplo, un canal de calcio; un receptor antigénico de células T; un receptor de quimiocinas; un canal de potasio; un receptor de neurotransmisores (por ejemplo, un receptor de serotonina; un receptor de GABA; un receptor de glutamato; un receptor nicotínico de acetilcolina; etc.); un receptor del factor de crecimiento (por ejemplo, receptor del factor de crecimiento epidérmico, receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, etc.); una proteína morfogénica ósea; un polipéptido que activa una ruta de señalización celular; y similares.

El componente polipeptídico de un conjugado de polipéptido-polímero sujeto es biológicamente activo. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente si un polipéptido dado es biológicamente activo, utilizando cualquiera de una serie de ensayos bien conocidos diseñados para probar una actividad biológica particular. Los ejemplos de ensayos útiles para polipéptidos biológicamente activos particulares incluyen, aunque sin limitaciones, GMCSF (Eaves, A. C. y Eaves C. J., Erythropoiesis en culture. En: McCullock E A (edt) Cell culture techniques--Clinics en hematology. W B Saunders, Eastbourne, pág. 371-91 (1984); Metcalf, D., International Journal of Cell Cloning 10: 116-25 (1992); Testa, N. G., et al., Assays for hematopoietic growth factors. En: Balkwill F R (edt) Cytokines A practical Approach, págs. 229-44; IRL Press Oxford 1991) EPO (bioassay: Kitamura et al., J. Cell. Physiol. 140 p323 (1989)); Hirudin (platelet aggregation assay: Blood Coagul Fibrinolysis 7(2):259-61 (1996)); IFN α (anti-viral assay: Rubinstein et al., J. Virol. 37 (2): 755-8 (1981); anti-proliferative assay: Gao Y, et al Mol Cell Biol. 19 (11): 7305-13 (1999); y bioensayo: Czarniecki et al., J. Virol. 49 p490 (1984)); GCSF (bioensayo: Shirafuji et al., Exp. Hematol. 17 p116 (1989); proliferación de células murinas NFS-60 (Weinstein et al, Proc Natl Acad Sci 83:5010-4 (1986)); insulina (3Ensayo de captación de ^3H -glucosa: Steppan et al., Nature 409(6818):307-12 (2001)); hGH (ensayo de proliferación Ba/F3-hGHR: J Clin Endocrinol Metab 85(11):4274-9 (2000); Norma internacional para la hormona del crecimiento: Horm Res, 51 Suppl 1:7-12 (1999)); factor X (ensayo de actividad factor X: Van Wijk et al. Thromb Res 22:681-686 (1981)); factor VII (ensayo de coagulación usando tiempo de coagulación de protrombina: Belaaouaj et al., J. Biol. Chem. 275:27123-8(2000); Diaz-Collier et al., Thromb Haemost 71:339-46 (1994)).

Los ensayos para la activación de una ruta de señalización celular son conocidos en la técnica. Los ensayos para la inducción de la proliferación celular son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ensayos de captación de ^3H -timidina, etc. Los ensayos para la inducción de la angiogénesis incluyen, por ejemplo, un ensayo de membrana corioalantoidea de pollo (CAM), un ensayo de células endoteliales in vitro, un ensayo de Matrigel, un sistema de angiogénesis discal y similares. Los ensayos para la inducción de la diferenciación celular son conocidos en la técnica e incluyen ensayos para detectar uno o más productos génicos asociados con un tipo de célula diferenciada.

Enlazadores

Como se ha indicado anteriormente, en algunas realizaciones, un conjugado de polipéptido-polímero sujeto comprende un grupo enlazador que une el polipéptido al polímero. Los enlazadores adecuados incluyen enlazadores peptídicos y enlazadores no peptídicos.

Un péptido enlazador puede tener cualquiera de diversas secuencias de aminoácidos. Ejemplos de enlazadores peptídicos tienen entre aproximadamente 6 y aproximadamente 40 aminoácidos de longitud o de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 25 aminoácidos de longitud. Los enlazadores de ejemplo incluyen enlazadores de poli(glicina) (por ejemplo, (Gly) $_n$, donde n es un número entero de 2 a aproximadamente 10); enlazadores que comprenden Gly y Ser; y similares.

Conjugación

Se pueden usar diversos métodos de conjugación y químicas para conjugar un polipéptido a un polímero. Se pueden usar diversos reactivos de reticulación de longitud cero, homobifuncionales y heterobifuncionales. Los reactivos de reticulación de longitud cero incluyen conjugación directa de dos grupos químicos intrínsecos sin introducción de material extrínseco. Los agentes que catalizan la formación de un puente disulfuro pertenecen a esta categoría. Otro ejemplo son los reactivos que inducen la condensación de un grupo carboxilo y un amino primario para formar un enlace amida, tales como carbodiimidias, cloroformiato de etilo, reactivo K de Woodward (5-fenilisoaxazolio-3'-sulfonato de 2-etilo) y carbonildiimidazol. Los reactivos homo y heterobifuncionales contienen generalmente dos sitios idénticos o dos diferentes, respectivamente, que pueden ser reactivos con grupos amino, sulfhidrilo, guanidino, indol o no específicos.

En algunas realizaciones, el polímero comprende un grupo amino reactivo para reaccionar con un grupo amino primario en el polipéptido, o en un enlazador. Los grupos amino-reactivos incluyen, aunque sin limitaciones, ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS), imidoésteres, isocianatos, haluros de acilo, arilazidas, ésteres de p-nitrofenilo, aldehídos y cloruros de sulfonilo.

En algunas realizaciones, el polímero comprende un grupo reactivo con sulfhidrilo, por ejemplo, para reaccionar con un residuo de cisteína en el polipéptido. Los grupos reactivos con sulfhidrilo adecuados incluyen, aunque sin limitaciones, maleimidias, haluros de alquilo, disulfuros de piridilo y tioftalimidias.

En otras realizaciones, las carbodiimidias solubles en agua y disolvente orgánico se usan como reactivos carboxilo-

reactivos. Estos compuestos reaccionan con los grupos carboxilo libres formando una seudourea que después se puede acoplar a las aminas disponibles dando un enlace amida.

5 Como se ha indicado anteriormente, en algunas realizaciones, un polipéptido se conjuga con un polímero usando un reticulante homobifuncional.

En algunas realizaciones, el reticulador homobifuncional es reactivo con aminas primarias. Los reticuladores homobifuncionales que son reactivos con aminas primarias incluyen ésteres de NHS, imidoésteres, isotiocianatos, isocianatos, haluros de acilo, arilazidas, ésteres de p-nitrofenilo, aldehídos y cloruros de sulfonilo.

10 Los ejemplos no limitantes de ésteres de NHS homobifuncionales incluyen glutarato de disuccinimidilo (DSG), suberato de disuccinimidilo (DSS), suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS), tartrato de disuccinimidilo (DST), tartrato de disulfosuccinimidilo (sulfo-DST), bis-2-(succinimidooxicarbonilo)etilsulfona (BSOCOES), bis-2-(sulfosuccinimidooxi-carbonilo)etilsulfona (sulfo-BSOCOES), etilenglicolbis(succinimidilsuccinato) (EGS),
15 etilenglicolbis(sulfosuccinimidilsuccinato) (sulfo-EGS), ditiobis(succinimidil-propionato) (DSP), y ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato) (sulfo-DSP). Los ejemplos no limitantes de imidoésteres homobifuncionales incluyen malonimidato de dimetilo (DMM), succinimidato de dimetilo (DMSC), adipimidato de dimetilo (DMA), pimelimidato de dimetilo (DMP), suberimidato de dimetilo (DMS), 3,3'-oxidipropionimidato de dimetilo (DODP), 3,3'-(metileno-dioxi)dipropionimidato de dimetilo (DMDP), 3'-(dimetileno-dioxi)dipropionimidato de dimetilo (DDDP), 3,3'-(tetrametileno-dioxi)-dipropionimidato de dimetilo (DTDP) y 3,3'-ditiobispropionimidato de dimetilo (DTBP).

20 Los ejemplos no limitantes de isotiocianatos homobifuncionales incluyen: p-fenilendiisotiocianato (DITC) y estilbena de ácido 4,4'-diisotiociano-2,2'-disulfónico (DIDS). Los ejemplos no limitantes de isocianatos homobifuncionales incluyen diisocianato de xileno, tolueno-2,4-diisocianato, tolueno-2-isocianato-4-isotiocianato, 3-metoxidifenilmetano-4,4'-diisocianato, 2,2'-dicarboxi-4,4'-azofenildiisocianato y hexametilendiisocianato. Ejemplos no limitantes de arilhaluros homobifuncionales incluyen 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno (DFDNB) y 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenil-sulfona. Ejemplos no limitantes de reactivos de aldehído alifáticos homobifuncionales incluyen glicoxal, malodialdehído y glutaraldehído. Ejemplos no limitantes e reactivos de acilación homobifuncionales incluyen ésteres de nitrofenilo de ácidos dicarboxílicos. Ejemplos no limitantes de cloruros de sulfonilo aromáticos homobifuncionales
25 incluyen cloruro de fenol-2,4-disulfonilo y cloruro de α -naftol-2,4-disulfonilo. Ejemplos no limitantes de reactivos homobifuncionales amino-reactivos adicionales incluyen bicarbonato de eritritol, que reacciona con aminas para dar biscarbamatos.

30 En algunas realizaciones, el reticulante homobifuncional es reactivo con grupos sulfhidrilo libres. Los reticulantes homobifuncionales reactivos con grupos sulfhidrilo libres incluyen, por ejemplo, maleimidias, disulfuros de piridilo y haluros de alquilo.

35 Los ejemplos no limitantes de maleimidias homobifuncionales incluyen bismaleimido-hexano (BMH), N,N'-(1,3-fenileno) bismaleimida, N,N'-(1,2-fenileno)bismaleimida, azofenildimaleimida, y bis(N-maleimidometil) éter. Ejemplos no limitantes de disulfuros de piridilo homobifuncionales incluyen 1,4-di-3'-(2-piridilditio)propionamidobutano (DPDPB). Los ejemplos no limitantes de haluros de alquilo homobifuncionales incluyen 2,2'-dicarboxi-4,4'-diyodoacetamidoazobenceno, ácido α,α' -diyodo-p-xilenosulfónico, ácido α,α' -dibromo-p-xilenosulfónico, N,N'-bis(bromoetil)bencilamina, N,N'-di(bromoacetil)fenilhidrazina, y 1,2-di(bromoacetil)amino-3-fenilpropano.

40 Como se ha indicado anteriormente, en algunas realizaciones, un polipéptido se conjuga con un polímero usando un reactivo heterobifuncional. Los reactivos heterobifuncionales adecuados incluyen reactivos amino-reactivos que comprenden un resto disulfuro de piridilo; reactivos amino-reactivos que comprenden un resto de maleimida; reactivos amino-reactivos que comprenden un resto de haluro de alquilo; y reactivos amino-reactivos que comprenden un resto de dihaluro de alquilo.

45 Los ejemplos no limitantes de reactivos heterobifuncionales con un resto de disulfuro de piridilo y un éster de NHS amino-reactivo incluyen 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 6-3-(2-piridilditio)propionamidohexanoato de succinimidilo (LC-SPDP), 6-3-(2-piridilditio)propionamidohexanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-LCSPDP), 4-succinimidiloxycarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)tolueno (SMPT) y 6- α -metil- α -(2-piridilditio)toluamidohexanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-LC-SMPT).
50

55 Los ejemplos no limitantes de reactivos heterobifuncionales con un resto de maleimida y un éster de NHS amino-reactivo incluyen maleimidilacetato de succinimidilo (AMAS), 3-maleimidilpropionato de succinimidilo (BMPS), éster de N- γ -maleimidobutiriloxisuccinimida (GMBS), éster de N- γ -maleimidobutiriloxisulfo succinimida (sulfo-GMBS), 6-maleimidilhexanoato de succinimidilo (EMCS), 3-maleimidilbenzoato de succinimidilo (SMB), éster de mmaleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-MBS), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC), 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimidilo (SMPB) y 4-(pmaleimidofenil)butirato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMPB).
60

65 Los ejemplos no limitantes de reactivos heterobifuncionales con un resto de haluro de alquilo y un éster de NHS

amino-reactivo incluyen (4-yodoacetil)aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB), 4-yodoacetil)aminobenzoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SIAB), 6-(yodoacetil)aminohexanoato de succinimidilo (SIAX), 6-(6-((yodoacetil)-amino)hexanoilamino)hexanoato de succinimidilo (SIAXX), 6-(((4-(yodoacetil)-amino)-metil)-ciclohexano-1-carbonil)aminohexanoato de succinimidilo (SIACX), y 4((yodoacetil)-amino)metilciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SIAC).

Un ejemplo no limitante de un reactivo heterobifuncional que comprende un éster de NHS amino-reactivo y un resto dihaluro de alquilo es 2,3-dibromopropionato de N-hidroxisuccinimidilo (SDBP). Un ejemplo no limitante de un reactivo heterobifuncional que comprende un resto de haluro de alquilo y un resto de éster de p-nitrofenilo amino-reactivo incluyen yodoacetato de p-nitrofenilo (NPIA).

Composiciones

La presente invención proporciona composiciones, incluidas composiciones farmacéuticas, que comprende un conjugado de polipéptido-polímero sujeto.

En algunas realizaciones, una composición sujeto comprende un conjugado de polipéptido-polímero sujeto, en la que el conjugado de polipéptido-polímero sujeto es homogéneo, por ejemplo, todos los polipéptidos del conjugado de polipéptido-polímero comprenden la misma secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición sujeto comprende una pluralidad de (por ejemplo, copias múltiples de) un conjugado de polipéptido-polímero sujeto, donde cada molécula de conjugado de polipéptido-polímero comprende polipéptidos que tienen todos la misma secuencia de aminoácidos.

En otras realizaciones, una composición sujeto comprende dos o más especies de un conjugado de polipéptido-polímero sujeto, por ejemplo, una composición sujeto comprende un primer conjugado de polipéptido-polímero, en la que el primer conjugado de polipéptido-polímero comprende polipéptidos de una primera secuencia de aminoácidos; y al menos un segundo conjugado de polipéptido-polímero, en el que el segundo conjugado de polipéptido-polímero comprende polipéptidos de una segunda secuencia de aminoácidos que es diferente de la primera secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, una composición sujeto comprende un tercer conjugado de polipéptido-polímero u otros adicionales. Como un ejemplo no limitante, un primer conjugado de polipéptido-polímero comprende un primer polipéptido que proporciona la unión a una integrina; y un segundo conjugado de polipéptido-polímero que comprende un segundo polipéptido que activa una ruta de señalización celular. Se pueden usar otras diversas combinaciones de polipéptidos primero, segundo, etc. La relación del primer conjugado de polipéptido-polímero y el segundo conjugado de polipéptido-polímero en una composición sujeto puede variarse, por ejemplo, de aproximadamente 0:001 a 10^3 a aproximadamente 10^3 a 0,001. De forma análoga, cuando una composición sujeto comprende un primer, un segundo y un tercer conjugado de polipéptido-polímero, las relaciones del primer, segundo y tercer conjugados polipéptido-polímero pueden variarse.

Una composición sujeto puede comprender, además de un conjugado de polipéptido-polímero sujeto, uno o más de: una sal, por ejemplo, NaCl, MgCl, KCl, MgSO₄, etc.; un agente tampón, por ejemplo, un tampón Tris, N-(2-hidroxi-etil) piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico) (HEPES), ácido 2-(N-Morfolino)etanosulfónico acid (MES), sal de sodio de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido N-tris(hidroxi)metilmetil-3-aminopropanosulfónico (TAPS), etc.; un agente solubilizante; un detergente, por ejemplo, un detergente no iónico, tal como Tween-20, etc.; un inhibidor de la proteasa; y similares.

La presente invención proporciona composiciones que comprenden un conjugado de polipéptido-polímero sujeto y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Vehículos excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, el vehículo puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o agentes tamponadores del pH. Los métodos reales para preparar dichas formas de dosificación se conocen o serán evidentes para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 17^a edición, 1985. La composición o formulación a administrar contendrá, en cualquier caso, una cantidad del agente adecuada para alcanzar el estado deseado en el sujeto que se está tratando. Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, vehículos o diluyentes, están fácilmente disponibles para el público. Además, las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como los agentes de ajuste y tamponamiento del pH, los agentes de ajuste de la tonicidad, los estabilizadores, los agentes humectantes y similares, están fácilmente disponibles para el público.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "vehículo farmacéuticamente aceptable" y "excipiente farmacéuticamente aceptable" se usan de forma indistinta e incluyen cualquier material que, cuando se combina con un conjugado de polipéptido-polímero sujeto, no afecta sustancialmente a la actividad biológica del conjugado, no induce una respuesta inmune en un huésped y no tiene ningún efecto fisiológico adverso sustancial en el huésped. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitaciones, cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsión aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Otros vehículos también pueden incluir soluciones estériles, comprimidos que incluyen comprimidos recubiertos y cápsulas. Normalmente, tales vehículos contienen excipientes tales como almidón, leche,

azúcar, determinados tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico y sales de los mismos, estearato de magnesio o calcio, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glicoles, u otros excipientes conocidos. Dichos vehículos pueden también incluir aditivos aromatizantes y colorantes u otros ingredientes. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se formulan mediante procedimientos convencionales bien conocidos.

5 Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para cualquier manera de administración apropiada, incluyendo, por ejemplo, administración tópica, oral, nasal, intravenosa, intracraneal, intraperitoneal, intratumoral, peritumoral, subcutánea o intramuscular. Para administración parenteral, tal como inyección subcutánea, el vehículo puede comprender agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para administración oral, se puede usar cualquiera de los vehículos anteriores o un vehículo sólido, tales como manitol, lactosa, almidón, 10 estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa y carbonato de magnesio. Las microesferas biodegradables (por ejemplo, polilactato poliglicolato) también se puede emplear como vehículos para una composición farmacéutica sujeto. Las microesferas biodegradables adecuadas se divulgan, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N.º 4.897.268 y 5.075.109.

15 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica sujeto se administra por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa. Por lo tanto, la invención proporciona composiciones para la administración parenteral que comprenden un conjugado sujeto disuelto o suspendido en un vehículo aceptable, preferentemente un vehículo acuoso, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina, solución salina tamponada con fosfato y similares. Las 20 composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximar las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste de pH y tamponadores, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similares.

25 Una composición sujeto se puede esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, o puede esterilizarse por filtración. Las soluciones acuosas resultantes se pueden envasar para su uso tal cual, o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones puede variar entre 3 y 11, por ejemplo, de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 9, o de aproximadamente pH 7 a aproximadamente pH 8.

30 Tejidos y dispositivos implantables

En algunas realizaciones, un conjugado de polipéptido-polímero sujeto recubre, forma una capa sobre, está incorporado en, o forma, un tejido o dispositivo implantable, por ejemplo, un tejido artificial; un implante en un tejido; un recubrimiento para un dispositivo implantable (como una endoprótesis vascular intravascular, una articulación 35 artificial, un armazón, un injerto (por ejemplo, un injerto aórtico), una válvula cardíaca artificial, una derivación de líquido cefalorraquídeo, una derivación coronaria, un electrodo de marcapasos, una derivación endocárdica, etc.); un sistema de administración de fármacos implantable; y similares. Los tejidos artificiales incluyen, por ejemplo, válvulas cardíacas sintéticas (por ejemplo, una válvula aórtica sintética, una válvula mitral sintética, etc.). Las endoprótesis vasculares incluyen, por ejemplo, endoprótesis vasculares autoexpansibles, endoprótesis vasculares expansibles 40 con balón e injertos de endoprótesis vascular. Los biomateriales incluyen, por ejemplo, películas, geles, esponjas, gasas, telas no tejidas, membranas, microesferas, microcápsulas, hebras, canales de guía y similares.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, un conjugado de polipéptido-polímero sujeto forma una capa o recubre o se une de otro modo a una matriz, para formar un dispositivo sintético implantable. Por ejemplo, una matriz (también denominada "sustrato biocompatible") es un material que es adecuado para la implantación en un sujeto y sobre el 45 cual un conjugado de polipéptido-polímero sujeto forma una capa, recubre o está de otro modo unido. Un sustrato biocompatible no causa efectos tóxicos o perjudiciales una vez implantado en el sujeto. En una realización, el sustrato biocompatible es un polímero con una superficie que puede conformarse en la estructura deseada que requiere reparación o reemplazo. El sustrato biocompatible también se puede conformar en una parte de una 50 estructura que requiere reparación o reemplazo. El sustrato biocompatible proporciona el marco de soporte sobre el que un conjugado de polipéptido-polímero sujeto puede estar formando capas, recubriendo o unido de otro modo.

En algunas realizaciones, una matriz o un armazón que comprende unido a la misma un conjugado de polipéptido-polímero sujeto comprende adicionalmente una o más células y/o uno o más tipos celulares unidos a la matriz o 55 armazón que comprende el conjugado de polipéptido-polímero. Tales matrices o armazones son útiles en el contexto de ingeniería de tejidos, cultivo celular, trasplante celular, etc.

En algunas realizaciones, un dispositivo de administración de fármacos comprende un conjugado de polipéptido-polímero sujeto, Por ejemplo, el dispositivo de administración de fármacos uede basarse en un sistema de difusión, un sistema convectivo o un sistema erosionable (por ejemplo, un sistema basado en la erosión). Por ejemplo, el 60 dispositivo de administración de fármacos puede ser una bomba electroquímica, una bomba osmótica, una bomba electroosmótica, una bomba de presión de vapor o una matriz osmótica de descarga osmótica, *por ejemplo*, cuando el fármaco se incorpora a un polímero y el polímero proporciona la liberación de la formulación del fármaco concomitante con la degradación de un material polimérico impregnado con fármaco (*por ejemplo*, un material 65 polimérico impregnado con fármaco y biodegradable). En otras realizaciones, el dispositivo de administración de fármacos puede basarse en un sistema de electrodifusión, una bomba electrolítica, una bomba efervescente, una

bomba piezoeléctrica, un sistema hidrolítico, etc.

5 En algunas realizaciones, el sistema de administración de fármaco implantable se puede programar para proporcionar la administración de un agente activo. Ejemplos de sistemas implantables programables incluyen bombas de infusión implantables. Ejemplos de bombas de infusión implantables o dispositivos útiles en conexión con tales bombas, se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 4.350.155; 5.443.450; 5.814.019; 5.976.109; 6.017.328; 6.171.276; 6.241.704; 6.464.687; 6.475.180; y 6.512.954. Otro dispositivo de ejemplo es la bomba de infusión SynchroMed (Medtronic).

10 Se puede usar un dispositivo de administración de fármacos implantable para administrar cualquiera de diversos agentes, por ejemplo, modificadores de la respuesta inmune, antiproliferativos, agentes antiapoptóticos, agentes antimitóticos, agentes antiplaquetarios, complejos de coordinación de platino, hormonas, anticoagulantes, agentes fibrinolíticos, agentes antiseoretos, agentes antimigratorios, inmunosupresores, agentes angiogénicos, bloqueantes del receptor de angiotensina, donantes de óxido nítrico, oligonucleótidos antisentido, inhibidores del ciclo celular, corticosteroides, esteroides angostáticos, fármacos antiinflamatorios, fármacos antiglaucoma, antibióticos, moduladores de diferenciación, medicamentos antivirales, medicamentos contra el cáncer y medicamentos antiinflamatorios.

UTILIDAD

20 Un conjugado de polipéptido-polímero sujeto encuentra uso en diversas aplicaciones, incluyendo aplicaciones terapéuticas (por ejemplo, administración de fármacos, dispositivos implantables, ingeniería tisular, medicina regenerativa), diagnóstico, descubrimiento de fármacos e investigación.

25 Aplicaciones terapéuticas

Un conjugado de polipéptido-polímero sujeto encuentra uso en diversas aplicaciones terapéuticas.

30 Por ejemplo, tal como se ha tratado anteriormente, un conjugado de polipéptido-polímero sujeto se puede unir a un dispositivo de administración de fármacos, donde el componente polipeptídico biológicamente activo del conjugado de polipéptido-polímero confiere una funcionalidad y donde el dispositivo de administración de fármacos proporciona un agente terapéutico. Por ejemplo, el polipéptido biológicamente activo podría proporcionar orientación a un tipo de célula o tipo de tejido en particular que necesita tratamiento con un agente terapéutico, y el dispositivo de administración de fármacos podría proporcionar el agente terapéutico de una manera localizada.

35 Como otro ejemplo, el componente polipeptídico biológicamente activo de un conjugado de polipéptido-polímero sujeto podría ser en sí mismo un agente terapéutico, por ejemplo, proporcionando inducción de la apoptosis en una célula tumoral; induciendo coagulación de la sangre en un sitio de tratamiento; inhibiendo la agregación plaquetaria; induciendo angiogénesis; induciendo la diferenciación celular; y similares.

40 Como otro ejemplo, tal como se ha tratado anteriormente, un conjugado de polipéptido-polímero sujeto se puede unir a un dispositivo médico implantable, por ejemplo, una endoprótesis vascular, una derivación, una válvula artificial, una derivación, una articulación artificial, un injerto, un electrodo, etc., donde el componente polipeptídico biológicamente activo del conjugado de polipéptido-polímero en cuestión proporciona una actividad deseada, por ejemplo, reducción de la reestenosis de hiperplasia de la neoíntima; inhibición de la proliferación celular; inhibición de la adhesión celular; y similares.

50 Como otro ejemplo, tal como se ha tratado anteriormente, un conjugado de polipéptido-polímero sujeto se puede unir a una matriz o un almacén, donde el conjugado de polipéptido-polímero proporciona la unión celular. La matriz o almacén que comprende un conjugado de polipéptido-polímero sujeto con o sin células unidas al conjugado de polipéptido-polímero se puede introducir en un individuo en el contexto del trasplante de células, ingeniería de tejidos, etc.

55 En algunas realizaciones, un conjugado de polipéptido-polímero en estudio encuentra uso en la inducción de angiogénesis (por ejemplo, cuando el polipéptido es uno que induce la angiogénesis) en un individuo que lo necesita, por ejemplo, en o cerca de un tejido isquémico.

Aplicaciones de investigación

60 Un conjugado de polipéptido-polímero sujeto encuentra uso en diversas aplicaciones de investigación, por ejemplo, para investigar una ruta de señalización celular; y similares. Un conjugado de polipéptido-polímero sujeto se puede administrar a un modelo de animal no humano experimental de una enfermedad, para analizar el efecto del conjugado de polipéptido-polímero en cuestión sobre una respuesta fisiológica en el modelo. Un conjugado de polipéptido-polímero sujeto también se puede usar en aplicaciones de detección selectiva de fármacos.

65

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se exponen para proporcionar a los expertos habituales en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo se efectúa y usa la presente invención y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni se pretende que representen que los siguientes experimentos sean todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero algunos errores y desviaciones experimentales deben tenerse en cuenta. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados centígrados y la presión es la atmosférica o próxima a esta. Pueden emplearse abreviaturas convencionales, por ejemplo, pb, pares de bases; kb, kilobases; pl, picolitros; s, segundos; min, minuto(s); h, horas; aa, aminoácidos; kb, kilobases; pb, pares de bases; nt, nucleótido(s); i.m., por vía intramuscular; i.p., por vía intraperitoneal; s.c., por vía subcutánea; y similares.

Ejemplo 1: Síntesis y caracterización de conjugados de polipéptido-polímero

Se produjo una forma multivalente potencialmente activa de la proteína Sonic hedgehog (Shh) mediante bioconjugación de una forma recombinante modificada de Shh a los polímeros lineales ácido poliacrílico (pAAc) y ácido hialurónico (HyA) mediante una reacción en dos etapas que explota la química de la carbodiimida y la maleimida. La eficacia de la conjugación fue de ~75% incluso en proporciones estequiométricas de 30 moléculas de Shh por cadena lineal de HyA (es decir, 30:1 de Shh:HyA). La bioactividad de los conjugados se analizó mediante un ensayo celular en un intervalo de relaciones estequiométricas de moléculas de Shh y cadenas lineales de HyA, que se varió de 0,6:1 de Shh:HyA a 22:1 de Shh:HyA. Los resultados indican que las bajas relaciones de conjugación disminuyen la bioactividad de Shh y las altas relaciones aumentan esta actividad más allá de la potencia de la Shh monomérica, con una actividad aproximadamente igual entre la Shh soluble monomérica y la Shh conjugada a 7:1 de Shh:HyA. Además, la relación alta genera una mayor angiogénesis determinada por el ensayo de membrana corioalantoica de pollo (CAM) in vivo. Estos resultados son capturados por un modelo cinético de interacciones múltiples entre los conjugados de Shh: HyA y los receptores de la superficie celular, que dan como resultado una señalización celular más alta a concentraciones de Shh más bajas.

Métodos

Shh recombinante y técnicas de bioconjugación

Usando el ADNc del dominio de señalización N-terminal de Shh de rata previamente descrito (15), los pares de bases que codifican un resto de cisteína adicional y un marcador de 6x His se añadieron mediante PCR en el extremo C de la proteína para permitir reacciones basadas en sulfhidrilo y purificación de proteínas, respectivamente. Este sitio de anclaje se eligió específicamente sobre la base de estudios que demuestran que esta área de la proteína está distante de su sitio activo y las moléculas inertes unidas aquí no alteran la actividad (16). El producto de PCR de Shh modificada producido se insertó en el plásmido apBAD-HisA (Invitrogen, Carlsbad, CA), el plásmido resultante se confirmó mediante secuenciación de ADN y la proteína se expresó en BL21 (DE3).pLys.E E. coli a través de la inducción con arabinosa. Después de la expresión de la proteína inducida, las células se lisaron y la Shh expresada resultante se purificó usando unión de NiNTA (Qiagen, Valencia, CA), seguida de la elución con imidazol. La proteína purificada se dializó en PBS a pH 7,4 que contiene 10 % de glicerol, EDTA 2mM y ZnSO₄ 50 μM.

La Shh purificada se conjugó a polímeros lineales a través de una reacción en 2 etapas usando la química de la carbodiimida en el grupo carboxilato del polímero y una reacción de maleimida en la cisteína C-terminal de la proteína (Figura 1). La primera etapa fue la adición de [N-ε-ácido maleimidocaproico] hidrazida (EMCH, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) al polímero lineal para permitir la posterior unión de la proteína. Este reticulador heterobifuncional de hidrazida-maleimida no inmunogénico se añadió a los dos polímeros lineales usando el mismo procedimiento general, pero con condiciones de reacción ligeramente diferentes. Para los conjugados de pAAc, pAAc de 450.000 Da (Polysciences, Warrington, PA) a 2 mg/ml se hizo reaccionar con hidrocloreuro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC) a 3,9 mg/ml, N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo- NHS) a 1,1 mg/ml y 0,5 mg/ml de EMCH a temperatura ambiente durante 2 horas en tampón MES a pH 6,5 como se describe para la unión de secuencias peptídicas pequeñas (17). Para la activación de HyA, se utilizó un método similar al descrito previamente para la unión de hidrazidas (9) con HyA de 10⁶ Da de PM. (Genzyme, Cambridge MA) Este se disolvió y se hizo reaccionar a 3 mg/ml con las mismas concentraciones de EDC, sulfo-NHS y EMCH utilizadas en la reacción de pAAc durante la noche en tampón MES 0,1 M, a pH 5,0. Después de la unión del EMCH, los polímeros lineales activados con maleimida resultantes se separaron de los reactivos no conjugados mediante dilución secuencial y centrifugación en filtros de centrifuga de corte de 50.000 de PM (Pall Gellman).

Los polímeros activados se hicieron reaccionar a continuación con Shh en proporciones de alimentación estequiométricas variables para producir conjugados de sustitución molecular variable. Esta reacción se realizó a 4 °C durante la noche en tampón MES 0,1 M (pH 6,5) que contenía hidrocloreuro de Tris (2-carboxietil) fosfina 50 μM (TCEP, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) para mantener la cisteína de Shh en C-terminal reducida durante la duración de la reacción. Después de la reacción, cualquier grupo maleimida restante en el polímero lineal se redujo

mediante la adición de ditiotreitol 0,5 mM e incubación a 4 °C durante 1 hora.

Todas las reacciones de conjugación se analizaron mediante electroforesis en gel, comparando las soluciones de reacción con una masa igual de Shh sin reaccionar para inspeccionar visualmente la eficacia del acoplamiento de proteínas. Además, los conjuntos de reacciones de conjugación de Shh:HyA por triplicado a relaciones de alimentación molar de 20:1 y 10:1 de Shh a HyA se dializaron durante la noche en tampón MES 0,1 (pH 6,5) usando dispositivos Spectra/Por® Float-A-Lyzer® (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA) para retirar la Shh no conjugada. Las concentraciones de proteína en las soluciones de HyA-Shh dializadas se cuantificaron a continuación usando un ensayo microBCA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

Ensayo de bioactividad

Con el fin de analizar la bioactividad, se indujeron células embrionarias C3H10T1/2 murinas (Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas VA) para diferenciarse en una línea osteogénica por exposición a Shh como se describe en otra parte (18, 19). En resumen, las células se sembraron en placas a 5000 células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio de crecimiento normal (αMEM con 10 % de FBS). Después de 2 días, el medio se reemplazó con un medio bajo en FBS (2 %) y se complementó con las proteínas y las soluciones de reacción conjugada. Las condiciones de prueba incluyeron Shh soluble en el intervalo de 1 - 100 nM, Shh soluble en el mismo intervalo junto con HyA no conjugado a 50 µg/ml, o el conjugado Shh:HyA en cantidades tales que la concentración de Shh en las soluciones de medios también fue 1 - 100 nM. Después de la incubación durante 3 días adicionales, las células se lavaron y se lisaron, y el lisado celular se ensayó para diferenciación midiendo la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) usando la sonda fluorescente 9- H- (1,3-dicloro-9,9- dimetilacridin-2-ona-7-il) fosfato (DDAO, Molecular Probes, Eugene OR). Se demostró que el ácido poliacrílico no conjugado inhibe la diferenciación de las células, por lo que no se realizó la prueba de bioactividad de estos conjugados.

Ensayo de angiogénesis

La Shh es un agente angiogénico conocido (20). La inducción de la angiogénesis a partir de Shh soluble y los conjugados de Shh:HyA se analizó usando un ensayo de ventana de CAM. Los huevos leghorn blancos fértiles (Charles River, Franklin CT) se incubaron a 37 °C en un ambiente humidificado hasta el día 8, en ese momento se extrajeron 2 ml de albúmina del extremo romo del huevo y se abrió una pequeña ventana de 1 cm x 1 cm en la cubierta del lado opuesto. Se colocaron cuadrados estériles de papel de filtro cargado con PBS estéril, 0,1 µg de Shh, o 0,1 µg de Shh del conjugado de relación de alimentación Shh: HyA 20:1 directamente sobre la CAM en desarrollo. Esta ventana se selló con parafilm y los huevos se devolvieron a la incubadora. La angiogénesis alrededor de los materiales de prueba se evaluó microscópicamente 3 días después usando un estereoscopio Olympus SZX7. Se tomaron fotomicrografías de alta resolución usando una cámara QImaging Qfire acoplada. Estas imágenes se analizaron utilizando el software ImageJ para cuantificar el número de vasos sanguíneos por unidad de longitud en un perímetro cuadrado que rodea los implantes a una distancia de 0,1 y 0,25 cm desde su borde. Las mediciones de la densidad lineal para cada grupo se analizaron para determinar la significación estadística usando un ANOVA de una vía en los datos de distancia de 0,1 y 0,25 cm, seguido de pruebas t de Holm por pares de los grupos individuales.

Modelado molecular de Shh: Señalización celular del conjugado de HyA

Los modelos numéricos de unión y tráfico que describen la expresión de efectores transcripcionales de Gli en respuesta a Shh monomérico (21, 22) y los modelos cinéticos numéricos que describen la unión multivalente ligando-receptor (23) (Figura 3) se construyeron sobre la señalización celular del conjugado Shh:HyA. En la figura 3, la red de señalización del núcleo de Shh y las reacciones hipotéticas que implican un conjugado multivalente se muestran alrededor de una célula representativa. Las flechas entre las proteínas representan unión o disociación, las flechas desde los genes a las proteínas representan la expresión, y las flechas desde las proteínas a los genes indican activación o represión. Smo, Smoothened. A nivel celular, Shh induce el cambio de destino celular al interactuar con su receptor transmembrana, Patched (Ptc). En ausencia de Shh, Ptc reprime la actividad de señalización de la proteína transmembrana Smo y, por lo tanto, actúa como un represor de la señalización de Shh como se ha descrito previamente (Lai et al., 2004). La regulación por aumento de *gli* upregulation representa retroalimentación positiva, mientras que la regulación por aumento de *ptc* proporciona retroalimentación negativa. Las simulaciones exploran el efecto de diversos mecanismos: unión del conjugado HyA:Shh (avidez); internalización de complejos conjugado-Ptc; y degradación de HyA: Shh.

Las ecuaciones no dimensionales para la señalización de Shh se muestran a continuación:

Para la transducción de señal de Shh soluble

$$\frac{\partial B}{\partial \tau} = -\alpha_{off} B + \alpha_{on} AD - \beta_{in} B + \gamma_{out} C$$

$$\frac{\partial C}{\partial \tau} = \beta_{in} B - \gamma_{out} C - \Theta_C C$$

$$\frac{\partial D}{\partial \tau} = \alpha_{off} B - \alpha_{on} AD + \alpha_p \text{Promoter} + \beta_p \text{Basal} + \epsilon_{out} E - \delta_m D$$

5

$$\frac{\partial E}{\partial \tau} = -\epsilon_{out} E + \delta_m D - \Theta_E E$$

$$AP = k_{AP} G_1$$

10

$$\frac{\partial G_1}{\partial \tau} = \alpha \text{Promoter} + \beta \text{Basal} - G_1$$

$$\frac{\partial G_3}{\partial \tau} = \frac{\gamma}{G_1} - G_3 * \left(\frac{\delta}{K_g 3rc + \text{Signal}} \right) - G_3$$

$$\frac{\partial G_{3R}}{\partial \tau} = G_3 * \left(\frac{\delta}{K_g 3rc + \text{Signal}} \right) - G_{3R}$$

15

$$\text{Signal} = \frac{1}{1 + \zeta D}$$

Para la transducción de señal del conjugado

20

Sustituirla $\frac{\partial B}{\partial \tau}$ expresión anterior con las siguientes expresiones para complejos de receptor-multivalente de superficie celular de valencia i ($Bcom_i$) y valencia máxima de f :

para $i=1$

25

$$\frac{\partial Bcom_1}{\partial \tau} = 2\alpha_{off} Bcom_2 - k_s \alpha_{on} (f-1) Bcom_1 D - \alpha_{on} AD - \alpha_{off} Bcom_1 + \alpha_{on} AD - \beta_m Bcom_1 + \gamma_{out} Ccom_1$$

para $i=[2, f-1]$

30

para $i=f$

$$\frac{\partial Bcom_i}{\partial \tau} = -i\alpha_{off} Bcom_i + k_s \alpha_{on} (f-i+1) Bcom_{i-1} D - (f-i)k_s \alpha_{on} Bcom_i D + (i+1)\alpha_{off} Bcom_{i+1} - \beta_m Bcom_i + \gamma_{out} Ccom_i$$

$$\frac{\partial Bcom_f}{\partial \tau} = -f\alpha_{off} Bcom_f + k_s \alpha_{on} Bcom_{f-1} D - \beta_m Bcom_f + \gamma_{out} Ccom_f$$

35

Sustituir la expresión $\frac{\partial C}{\partial \tau}$ anterior con las siguientes expresiones para complejos de receptor-multivalente interbalizados de valencia i ($Ccom_i$):

para $i=[1, f]$

40

$$\frac{\partial Ccom_i}{\partial \tau} = \beta_m Bcom_i - \gamma_{out} Ccom_i - \Theta_C Ccom_i$$

Sustituir la expresión $\frac{\partial D}{\partial \tau}$ anterior con las siguientes:

$$\frac{\partial D}{\partial \tau} = \alpha_{off} \sum_1^f (i) Bcom_i - k_x \alpha_{on} \sum_1^{f-1} (f-i) Bcom_i - \alpha_{on} AD + \alpha_p Promoter + \beta_p Basal + \epsilon_{out} E - \delta_m D$$

5 La condiciones iniciales, parámetros y descripciones de las variables se enumeran con sus fuentes bibliográficas en la Tabla 1. Los términos "promotor" y "basal" se han definido previamente (Lai, Robertson et al. 2004). Véase Saha y Schaffer Development, 2006 para el análisis de sensibilidad de los parámetros en la red de Shh soluble.

10 Para desarrollar el modelo más simple para los datos de bioactividad de C3H10T1/2 en la Figura 4 se invocaron las siguientes suposiciones: la represión con Patched (Ptc) de Smoothened no se ve afectada por la agregación del receptor de Ptc; la velocidad de internalización inducida por ligando es la misma para todas las valencias; la actividad de la fosfatasa alcalina es linealmente proporcional a los niveles de Gli1 en una célula; y la diferenciación de una célula C3H10T1/2 no cambia su capacidad de respuesta a Shh. Se supuso que la unión inicial del conjugado HyA:Shh seguía las velocidades de unión a Shh-Ptc monoméricas, pero se suponía que todas las demás uniones adicionales de restos de Shh del conjugado a otros receptores de Ptc se producían a una velocidad mayor. Esta suposición se ha denominado la *hipótesis del sitio equivalente* para tener en cuenta la aceleración de la unión después de la unión inicial de un conjugado multivalente (24).

15 Los parámetros del modelo se tomaron de la literatura (21, 22); sin embargo, se estimó una serie de parámetros directamente a partir de los datos de bioactividad en la Figura 4. En primer lugar, la constante de unión de Shh-Ptc monomérica k_{on}/k_{off} y la relación actividad de la fosfatasa alcalina: expresión de Gli1 se estimaron a partir de la curva de bioactividad de Shh soluble. Además, la constante de unión de Shh-Ptc multimérica se estimó directamente a partir de la curva del conjugado 22: 1 (véase la Tabla 1). Los parámetros se tomaron de la literatura de Shh o de sistemas de receptor-ligando similares. Todas las constantes de velocidad celular se promedian dentro del volumen o superficie de la célula, ya que no se sabe que estas constantes varíen espacialmente dentro de una célula. Las condiciones iniciales para los resultados de simulación que se muestran en la Figura 7 se enumeran con cada variable. Una forma conveniente de entender la importancia relativa de cada término en las ecuaciones diferenciales es comparar las concentraciones y los parámetros no dimensionales en la Tabla 1.

Tabla 1. Definiciones de parámetros e intervalos de valores.

Ruta principal de señalización						
Parámetro dimensional	Descripción	Valor/Intervalo	Fuente	Parámetro no dimensional	Valor/Intervalo	Nondimensionalización
[Shh]	Concentración de Shh extracelular	Condición inicial = 0	variable	A	Condición inicial = 0	$(\text{mol de Shh de membrana}) / (\text{L de volumen de líquido extracelular}) / (\text{KgGli3}) / (\text{vff})$
[PtcShh _n]	Concentración de PtcShh extracelular	Condición inicial = 0	variable	B	Condición inicial = 0	$(\text{mol de Ptc-Shh de membrana}) / (\text{L de volumen de líquido extracelular}) / (\text{KgGli3}) / (\text{vff})$
[PtcShh _{out}]	Concentración de PtcShh intracelular	Condición inicial = 0	variable	C	Condición inicial = 0	$(\text{mol de Ptc-Shh intracelular}) / (\text{L de volumen de líquido intracelular}) / (\text{KgGli3})$
[Ptc _{out}]	Concentración de Ptc extracelular	Condición inicial = 2,0 nM	variable	D	Condición inicial = 0,605	$(\text{mol de Ptc libre de membrana}) / (\text{L de volumen de líquido extracelular}) / (\text{KgGli3}) / (\text{vff})$
[Ptc _n]	Concentración de Ptc intracelular	Condición inicial = 0,33 nM	variable	E	Condición inicial = 0,402	$(\text{mol de Ptc-Shh intracelular}) / (\text{L de volumen de líquido intracelular}) / (\text{KgGli3})$
[Gli1]	Concentración de Gli 1 intracelular	Condición inicial = 1,63 nM	variable	G ₁	Condición inicial = 1,97	$(\text{mol de Gli 1 intracelular}) / (\text{L de volumen de líquido intracelular}) / (\text{KgGli3})$
[Gli3]	Concentración de Gli3 intracelular	Condición inicial = 5,81 nM	variable	G ₃	Condición inicial = 7,00	$(\text{mol de Gli 3 intracelular}) / (\text{L de volumen de líquido intracelular}) / (\text{KgGli3})$
[Gli3R]	Concentración del represor Gli3 intracelular	Condición inicial = 61,2 nM	variable	G _{3R}	Condición inicial = 18,44	$(\text{mol de represor Gli 3 intracelular}) / (\text{L de volumen de líquido intracelular}) / (\text{KgGli3})$
vf	Fracción de vacío de tejido	0,2	(Lauffenburger y Linderman 1993)			
vff	volumen intracelular / volumen extracelular	4	(1-vf)/vf			

k_{deg}	Constante de la velocidad de degradación para Gli 1	$0,009 \text{ min}^{-1}$	(Chen, Kessler et al. 1999)			
K_{Gli3}	Constante de disociación para la unión de Gli3 binding al sitio de unión de ADN de Gli 1	$8,3 \times 10^{-10} \text{ M}$	(Lai, Robertson et al. 2004)			
K_{shh}	Constante de disociación para la unión de Shh-Ptc	$8,5 \times 10^{-10} \text{ M}$ para el modelo sin química estérica; $4,5 \times 10^{-9} \text{ M}$ para el modelo con química estérica	(Fuse, Maiti et al. 1999; Taipale, Cooper et al. 2002)			
k_{off}	Disociación de Shh de Ptc	$0,10 \text{ min}^{-1}$	$0,3 \text{ min}^{-1}$ para EGF (Lauffenburger y Linderman 1993)	α_{off}	11	k_{off}/k_{deg}
k_{on}	Asociación de Shh con Ptc	$120.000.000 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para el modelo sin química estérica; $22.666.667 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para el modelp con química estérica;	k_{off}/k_{shh}	α_{on}	44,44	$k_{on} * (K_{Gli3} * v_{ff})/k_{deg}$
k_{cdeg}	Constante de la velocidad de degradación para el complejo de Shh-Ptc intracelular	$0,00198 \text{ min}^{-1}$	$0,0022 \text{ min}^{-1}$ para EGF (Lauffenbu rger y Linderman 1993)	Θ_c	0,220	k_{cdeg}/K_{deg}
k_{pin}	Importar al endosoma de receptores libres en la superficie	$0,03 \text{ min}^{-1}$	para EGFR (Lauffenbu rger y Linderman 1993)	δ_{in}	3,33	k_{pin}/k_{deg}
k_{pout}	Reciclar a la superficie de los receptores libres endosómicos	$0,00036 \text{ min}^{-1}$	$0,058 \text{ min}^{-1}$ (Lauffenbu rger y Linderman 1993); $0,003 \text{ min}^{-1}$ para Dpp (Lander, Nie et al. 2002)	ϵ_{out}	0,0403	k_{pout}/k_{deg}
k_{cin}	Importar al endosoma de complejos unidos a Shh en la superficie	$0,2 \text{ min}^{-1}$	$0,03-0,3 \text{ min}^{-1}$ para EGF (Lauffenbu rger y Linderman 1993)	β_{in}	33,3	k_{cin}/k_{deg}
k_{cout}	Exportar a la superficie de complejos unidos a Shh intracelular	$0,00181 \text{ min}^{-1}$	$0,00402 \text{ min}^{-1}$ para Dpp (Lander, Nie et al. 2002)	γ_{out}	0,20	k_{cout}/k_{deg}
k_{Gmax}	Velocidad máxima de la síntesis de Gli	$1,99 \times 10^{-10} \text{ M min}^{-1}$	$2,4 \times 10^{-10} \text{ M min}^{-1}$	α	30,4	$k_{Gmax}/(k_{Gli3} * K_{deg})$

k_{Gbas}	Velocidad basal de la síntesis de Gli	$1,53 \times 10^{-12} \text{ M min}^{-1}$	$k_{Gmax}/130$	β	0,233	$k_{Gbas}/(k_{Gli3} * k_{deg})$
r_{g3b}	Velocidad basal de la síntesis de Gli3	$3,1 \times 10^{-19} \text{ M}^2 \text{ min}^{-1}$	$1,6 \times 10^{-19} \text{ M}^2 \text{ min}^{-1}$ (Lai, Robertson et al. 2004)	γ	50,0	$r_{g3b} / (k_{Gli3} * k_{Gli3} * k_{deg})$
k_{Pdeg}	Constante de la velocidad de degradación para Ptc	$0,09 \text{ min}^{-1}$	$0,045-0,071 \text{ min}^{-1}$ (French y Lauffenbur ger 1996); $0,006 \text{ min}^{-1}$ (Lander, Nie et al. 2002)	Θ_E	10,0	k_{Pdeg}/k_{deg}
k_{Ptc}	Conc. semimáxima para Ptc que inhibe la señalización de Smo	$3,32 \times 10^{-11} \text{ M}$	$8,3 \times 10^{-11} \text{ M}$ (Taipale, Cooper et al. 2002)	ξ	2,50	k_{Gli3} / k_{Ptc}
k_{g3r}	Constante de la velocidad para la conversión de Gli3 en Gli3R	$0,0117 \text{ min}^{-1}$	$0,0117 \text{ min}^{-1}$ (Lai, Robertson et al. 2004)	δ	1,30	k_{g3r}/k_{deg}
k_{Pmax}	Velocidad máxima de la síntesis dePtc	$1,50 \times 10^{-10} \text{ M min}^{-1}$	$7,5 \times 10^{-10} \text{ Mmin}^{-1}$ (Lai, Robertson et al. 2004); A partir de la curva soluble en la Figura 3	α_p	5,01	$k_{Pmax}/(k_{Gli3} * v_{ff} * k_{deg})$
k_{Pbas}	Velocidad basal de la síntesis dePtc	$1,15 \times 10^{-12} \text{ M min}^{-1}$	$k_{pmax} /130$	β_p	0,0385	$k_{Pbas}/(k_{Gli3} * v_{ff} * k_{deg})$
k_{g3rc}	Constante de sensibilidad de la conversión en la fuerza de la señal	0,12	0,1 (Lai, Robertson et al. 2004)			
bc	Cooperatividad de la unión	1	(Keller 1995)			
tc	Eficiencia de la transcripción	0,5	(Keller 1995)			
r	Represión de Transcriptiona 1	0,2	(Lai, Robertson et al. 2004)			
Afr	Relación de afinidad entre Gli1 y Gli3 para el sitio de la unión a ADN	0,5				

Reacciones de conjugado multivalente						
k_{AP}	Relación entre la proteína Gli 1 y las unidades RFU de la actividad de fosfatasa alcalina	9,3	A partir de la curva soluble en la Figura 3			
$[PtcShh_{i, in}]$	Concentración de PtcShh extracelular de valencia i	Condición inicial = 0	variable	$Bcom_i$	Condición inicial = 0	(mol de complejo Ptc-Shh de membrana)/(L de volumen de líquido extracelular)/(Kgli3)/(vff)
$[PtcShh_{i, out}]$	Concentración de PtcShh intracelular de valencia i	Condición inicial = 0	variable	$Ccom_i$	Condición inicial = 0	(mol de complejo Ptc-Shh intracelular)/(L de volumen de líquido intracelular)/(Kgli3)
i	Índice de valencia a la valencia máxima de f		1, 2, 3, ...f			
k_x	Factor por el cual la unión del segundo y otros restos de Shh sobre el conjugado se unen a Ptc	12	A partir de la curva 22:1 en la Figura 3			

ES 2 656 350 T3

También se formuló un modelo alternativo que incorpora impedimento estérico de las cadenas de HyA como una reducción simple en la afinidad de unión del conjugado a Ptc. Para el modelo alternativo que incorpora química estérica, denominado "*modelo con química estérica*", la constante de unión multimérica de Shh-Ptc k_{on} para las relaciones de alimentación de conjugación de 0,6:1, 3,5: 1 y 7:1 se redujo 5.5 veces para coincidir con los datos experimentales de la curva 0,6:1 en la Figura 4. A continuación se muestra el código BERKELEY MADONNA para las simulaciones de un conjugado multivalente, donde $f=5$ (5:1 del conjugado Shh:HyA). El código siguiente se denomina "modelo sin química estérica" en el texto principal. Como se menciona en la sección Métodos, para el "modelo con química estérica", solo se realizó un cambio de parámetro: la constante de unión multimérica de Shh-Ptc k_{on} se redujo 5.5 veces para coincidir con los datos experimentales de la curva 0,6:1 en la Figura 4.

```

10  MÉTODO RK4

    TIEMPO DE INICIO = 0
    TIEMPO DE FINALIZACIÓN=500
15  DT = 0,0000002

    Shh=S*Kshh
    ;-----
    ;Definir el promotor y la variable basal de Lai et. al. Biophys J. 2004
20
    ; K1 = constante de unión de la disociación en equilibrio de Gli1
    ; K2 = constante de unión de la disociación en equilibrio de Gli3
    ; afr = relación de afinidad = K2/K1
    ; bc = cooperatividad de la unión
25  ; tc = cooperatividad de la transcripción
    ; r = relación de represión
    ;-----

    ; Gli promotor del núcleo y expresiones basales de Lai et. al. Biophys J. 2004
30
    Promotor=((afr*G1 + G3)*(afr^2*bc^2*G1^2 + 3*tc^2 + 3*bc*tc*(G3 + 2*G3R*r*tc) +
    afr*bc*G1*(2*bc*G3 + 3*tc + 3*bc*G3R*r*tc) + bc^2*(G3^2 + 3*G3*G3R*r*tc +
    3*G3R^2*r^2*tc^2)))/(1 + afr^3*bc^2*G1^3 + bc^2*G3^3 + 3*bc*G3R^2 +
35  bc^2*G3R^3 + 3*bc*G3^2*(1 + bc*G3R) + 3*G3*(1 + bc*G3R)^2 + 3*afr^2*bc*G1^2*(1 +
    bc*(G3 + G3R)) + 3*afr*G1*(1 + bc*(G3 + G3R))^2)

    Basal=((1 + afr^3*bc^2*G1^3 + bc^2*G3^3 + 3*G3R*r + 3*bc*G3R^2*r^2 + bc^2*G3R^3*r^3
    + 3*bc*G3^2*(1 + bc*G3R*r) + 3*G3*(1 + bc*G3R*r)^2 + 3*afr^2*bc*G1^2*(1 + bc*(G3 +
40  G3R*r)) + 3*afr*G1*(1 + bc*(G3 + G3R*r))^2)/(1 + afr^3*bc^2*G1^3 + bc^2*G3^3 +
    3*G3R + 3*bc*G3R^2 + bc^2*G3R^3 + 3*bc*G3^2*(1 + bc*G3R) + 3*G3*(1 + bc*G3R)^2 +
    3*afr^2*bc*G1^2*(1 + bc*(G3 + G3R)) + 3*afr*G1*(1 + bc*(G3 + G3R))^2)

    ;-----
    ;Definir constantes dimensionales para la unión de Shh y ecuaciones de transporte
45  ;-----

    koff=0,1; disociación de Shh de Ptc (min-1)
    kdegc=0,00198; Constante de la velocidad de degradación para el complejo de Shh-Ptc
    (min-1)
50  kp=0,03; Lauffenburger para EGF keR=3e-2 min-1 (p95)
    kq=0,00036; Lauffenburger para EGF krec=5,8e-2 min-1 (p95)
    kin=0,021; Lauffenburger para EGF kec=0,03-0,3 min-1 (p95)
    kout=0,00181; Exportar a la superficie del complejo Shh-Ptc intracelular (min-1)
    kg=0,09; Constante de la velocidad de degradación para Ptc (0,045-0,071 min-1)
55  kon=koff/Kshh; Asociación de Shh con Ptc

    vf=0,2; Fracción de vacío de tejido
    vff=(1-vf)/vf; factor de la Fracción de vacío= volumen intracelular/volumen
    extracelular
60

    Do=2,0e-9; Concentración inicial de Ptc libre para en (mol de Ptc libre de
    membrana)/ (L de volumen de líquido extracelular)
    Eo=0,33e-9; Concentración inicial de Ptc interno para en (mol de Ptc interno)/ (L de
    volumen de líquido intracelular)
65

    ;-----
    ;Definir constantes no dimensionales

```

ES 2 656 350 T3

```

; tiempo en unidades de 1/kdeg, Constante de la velocidad de degradación para Gli 1
(0,009 min-1)
;-----

5  theta e=kg/kdeg
   alfa off=koff/kdeg

   alfa_on=kon*(Kgli3*vff)/kdeg

10  beta in=kin/kdeg

   gamma_out=kout/kdeg
   theta c=kdegc/kdeg

15  alfa_p=kcatp/(Kgli3*vff*kdeg)
   beta_p=rbas/(Kgli3*vff*kdeg)
   eps out=kq/kdeg
   dlta in=kp/kdeg

20  ce=Kgli3/Kptc
;-----
;Definir ecuaciones de unión de Shh no dimensionales

; Variables no dimensionales:
25  ;A = (mol Shh)/(L de volumen de líquido extracelular)/(Kgli3)/(vff)
   ;B = (mol de Ptc-Shh de membrana )/(L de volumen de líquido
extracelular)/(Kgli3)/(vff)
   ;C = (mol de Ptc-Shh intracelular )/(L de volumen de líquido intracelular)/(Kgli3)
   ;D = (mol de Ptc libre de membrana )/(L de volumen de líquido
30  extracelular)/(Kgli3)/(vff)
   ;E = (mol de Ptc-Shh intracelular )/(L de volumen de líquido intracelular)/(Kgli3)

; Modelo multimérico de Lauffenberger 1993; Perelson 1986
35  ;Bcom[i] = (mol de complejo Ptc-Shh[i] de membrana )/(L de volumen de líquido
extracelular)/(Kgli3)/(vff)
   ;Ccom[i] = (mol de complejo Ptc-Shh[i] intracelular )/(L de volumen de líquido
intracelular)/(Kgli3)
;-----
40  d/dt (A) = 0

d/dt (D) = (alfa p)*Promotor + (beta p)*Basal + (eps out)*E -
(alfa_on)*A*D+k_x*Sum2-kx*Su ml*D - (dlta_in)*D
d/dt (E) = (dlta_in)*D-(eps_out)*E-(theta_e)*E

45  sum1v[1..(f-1)]=(f-i)*Bcom[i]
   su ml=arraysum(su mlv[*])
   sum2v[1..f]=(i)*Bcom[i]
   sum2=arraysum(sum2v[*])

50  f=5; valencia máxima
   INIT Bcom[1..f] = 0
d/dt (Bcom[1]) = (alfa_on)*A*D - (alfa_off)*Bcom[1] - (f-1)*kx*Bcom[1]*D
+2*k_x*Bcom[2] -(beta in)*Bcom[1] + (gamma out)*Ccom[1]

55  d/dt (Bcom[2..(f-1)]) = (f-i+1)*kx*Bcom[i-1]*D - i*k_x*Bcom[i] - (f-i)*kx*Bcom[i]*D
+ (i+1)*k_x*Bcom[i+1] - (beta in)*Bcom[i] + (gamma out)*Ccom[i]

d/dt (Bcom[f]) = kx*Bcom[i-1]*D - f*k_x*Bcom[i] - (beta_in)*Bcom[i] +
60  (gamma_out)*Ccom[i]

INIT Ccom[1..f] = 0

d/dt (Ccom[1..f]) = (beta in)*Bcom[i] - (gamma out)*Ccom[i] - (theta c)*Ccom[i]

65  INIT A=Shh/(Kgli3*vff)
   INIT D=Do/(Kgli3*vff)

```

ES 2 656 350 T3

```

INIT E=Eo/(Kgli3)

Señal=1/(1+ce*D); fracción de Smo no unido, según rxn de Scatchard entre Ptc y Smo

5  kxfactor=12; aceleración de kon para Shh multimérico tras la unión inicial
   kx=alfa en*kxfactor
   k_x=alfa_off

;-----
10 ;Definir ecuaciones intracelulares

; Variables no dimensionales:
;G1 = (mol Gli1)/(L de volumen líquido intracelular)/(Kgli3)
;G3 = (mol de forma activadora de Gli3)/(L de volumen de líquido
15 intracelular)/(Kgli3)
;G3R = (mol de la forma represora de Gli3R)/(L de volumen líquido
intracelular)/(Kgli3)
;-----
20 d_G1=(alfa)*Promotor + (beta)*Basal - G1

d/dt (G1) = (alfa)*Promotor + (beta)*Basal - G1
d/dt (G3) = (gamma)/(G1+const) - G3*(1+(dlta)/(Kg3rc+Signal))
d/dt (G3R) = G3*(dlta)/(Kg3rc+Signal) - G3R

25 G3o=5,81e-9
   G3Ro=61,2e-9
   Glo=1,63e-9

INIT G1=Glo/Kgli3
INIT G3=G3o/Kgli3
INIT G3R=G3Ro/Kgli3
;-----
;Definir las constantes dimensionales para intracelular
;-----
35 ecuaciones factor basal=130
kcatg=1,992732e-10; velocidad máxima de la síntesis de Gli (2,4e-10 M/min)
rgbas=2,74e-10/factor basal; Velocidad basal de la síntesis de Gli (vmax,g/100)
kcatp=1,5e-10; velocidad máxima de la síntesis de Ptc (4,5e-10 M/min)
40 rbas=2,25e-9/factor basal; Velocidad basal de la síntesis de Ptc (vmax,P/100)
rg3b=3,1e-19; velocidad basal de la síntesis de gli3(1,6e-19 M2/min)
Kshh=8,3e-10; Constante de disociación para la unión de Shh-Ptc
Kgli3=8,3e-10; usado para Kptc
kdeg=0,009; Constante de la velocidad de degradación para Gli 1 (0,009 min-1)
45 kdegp=0,09; Constante de la velocidad de degradación para Ptc (0,045-0,071 min-1)
Kptc=3,32e-11; Conc. semimáxima para Ptc que inhibe la señalización de Smo
kg3r=0,0117; Constante de la velocidad para la conversión de Gli3 en Gli3R (0,012
min-1)
Kg3rc=0,12; Constante de sensibilidad de la conversión en la fuerza de la señal

50 by=1; Cooperatividad de la unión
tc=0,5; Eficiencia de la transcripción
r=0,2; Represión de la transcripción
afr=0,5; relación de afinidad

55 S=120

alfa=kcatg/(Kgli3 *kdeg)
beta=rgbas/(Kgli3 *kdeg)
60 gamma=rg3b/(Kgli3 *Kgli3 *kdeg)
dlta=kg3r/kdeg epsilon=kcatp/(kdeg*Kgli3)
etta=rbas/(Kgli3 *kdeg)
const=1e-30

```

Resultados

Conjugación química

5 Se construyó, expresó y purificó una variante de Shh de rata recombinante con un resto de cisteína cerca del extremo C a través de cromatografía de afinidad de metal inmovilizada. La conjugación de la proteína recombinante se logró tanto en pAAc como en HyA con alta eficacia. Utilizando electroforesis en gel, era evidente que la reacción produjo una disminución en la banda de Shh monomérica (Figura 2) y la aparición de un conjugado de alto peso molecular. Para pAAc (Figura 2A) (PM = 450.000), esto produjo una extensión a través del gel con una masa creciente a medida que la relación de alimentación molar de conjugación de Shh aumentó de 1:1 a 30:1. Para HyA (PM = 106 Da), los conjugados de alto peso molecular no penetraron profundamente en el gel (Figura 2B). Por el contrario, simplemente mezclar la Shh con pAAc o HyA sin procesar no alteró la movilidad de Shh en el gel. El análisis de proteínas de las reacciones de Shh:HyA purificadas a relaciones de alimentación molar de 10:1 y 30:1 molar realizadas por triplicado indicó que la reacción era reproducible con un alto grado de eficacia a aproximadamente 70-75 % (Tabla 2). Las relaciones de alimentación molar de 1:1, 5:1, 10:1, 20:1, y 30:1 produjeron conjugados de Shh: HyA con relaciones de sustitución molar de 0,6:1, 3,5:1, 7:1, 14:1, y 22:1, respectivamente.

Tabla 2: Relaciones de conjugación determinadas y eficiencias del acoplamiento para las reacciones de Shh:HyA a relaciones de alimentación molar de 30:1 y 10:1.

	Relación molar de Shh:HyA		Acoplamiento en porcentaje	
Relación de alimentación	30:1	10:1	30:1	10:1
Ensayo 1	21,80	6,91	73,3 %	69,8%
Ensayo 2	22,58	6,65	76,0%	67,1%
Ensayo 3	22,09	7,02	74,3%	70,8%
Promedio	22,16	6,86	74,5%	69,2%
Desviación estándar	0,40	0,19	1,3%	1,9%

Ensayo de bioactividad de células C3H10T1/2 Cell

25 Mediante el uso de la línea celular embrionaria murina C3H10T1/2, se demostró que la conjugación de la Shh alteraba drásticamente la actividad de la proteína anclada cuando se evaluó frente a la concentración real de Shh en solución (Figura 4). Solo se pudo analizar el conjugado de Hyh utilizando esta línea celular, ya que pAAc inhibía la diferenciación que induce la Shh soluble en la línea celular. Con un anclaje bajo (por ejemplo, 3,5:1), la actividad disminuyó, con un aumento estimado de 10 veces en la CE₅₀ de la Shh en solución, presumiblemente debido a impedimentos estéricos que el polímero lineal grande causó cuando se unió. La actividad volvió a la normalidad cuando la relación de conjugación alcanzó 7:1. Más allá de esto, la actividad de la Shh anclada se incrementó drásticamente, con una disminución de 10 veces en los valores de CE₅₀ con respecto a la Shh no anclada a la construcción 22:1.

Modelo de angiogénesis de CAM

35 Los resultados del CAM indicaron una mayor potencia para la Shh:HyA conjugada. El análisis y la cuantificación fotográfica (Figuras 5 y 6, respectivamente) revelaron un aumento estadísticamente significativo de la vasculatura alrededor de las muestras cargadas con Shh en comparación con el control negativo a una distancia cercana (0,1 mm) del implante. Mientras que el Shh:HyA conjugado en una proporción de 14:1 tenía un número promedio de vasos aumentado tanto para el control negativo como para Shh no conjugada a 0,1 cm, también tenía un aumento persistente de más largo alcance sobre el control negativo a 0,25 cm. Aunque la Shh soluble también tenía un número promedio de vasos aumentado sobre el control negativo a esta distancia, esta observación no fue estadísticamente significativa

Modelado numérico de la bioactividad de Shh multivalente

50 Se desarrollaron modelos cinéticos simples de la unión del conjugado HyA:Shh, el tráfico y la activación de señal en sentido descendente. Para centrarse en los efectos de la multivalencia del conjugado, se invocaron una serie de supuestos en los modelos simplificados: la agregación del receptor de Ptc no afecta a la transducción de la señal; la internalización del ligando no se ve afectada por la valencia; la actividad de fosfatasa alcalina es linealmente proporcional a los niveles de Gli1 en una célula independientemente de la diferenciación; y solo se producen dos velocidades de unión del conjugado: una unión inicial del conjugado y una velocidad de unión más alta para todos los restos de Shh adicionales del conjugado a otros receptores de Ptc (véase la sección de Métodos para ecuaciones de modelos y la Tabla 1 para los parámetros). Con estas suposiciones, se desarrollaron dos tipos de

modelos, uno que incorporaba el impedimento estérico de las cadenas de HyA como una simple reducción en la afinidad de unión del conjugado a Ptc, y uno que rechaza cualquier influencia del impedimento estérico. Estos dos modelos se denominaron "modelo con química estérica" y "modelo sin química estérica", respectivamente. Bajo estas suposiciones, los resultados del modelado indicaron que el aumento de la relación de conjugación de Shh a su vehículo de HyA en el ensayo de bioactividad debería dar como resultado un aumento progresivo en la señalización celular y la disminución en la CE₅₀ (Figura 7). Los valores estimados de la CE₅₀ de los datos experimentales se combinaron bien utilizando ambos tipos de modelos cinéticos a las relaciones de conjugación probadas y con las suposiciones antes mencionadas ($R^2= 0,7$ para el modelo sin química estérica; $R^2= 0,8$ para el modelo con química estérica). Para el modelo sin química estérica, los valores de CE₅₀ coincidieron bien con los resultados experimentales a altas relaciones de conjugación, pero los resultados del modelado sobreestimaron los valores de CE₅₀ para relaciones de conjugación 7:1 e inferiores (Figura 7). Los resultados del modelo con química estérica pueden corregir esta desviación (Figura 7).

Referencias

- (1) Kuhl, P. R., y Griffiths, L. G. (1996) Tethered epidermal growth factor as a paradigm for growth factor-induced stimulation from the solid phase. *Nature Medicine* 2, 1022-1027.
- (2) Moon, J. J., Lee, S. H., y West, J. L. (2007) Synthetic biomimetic hidrogels incorporated con Ephrin-A1 for therapeutic angiogenesis. *Biomacromolecules* 8, 42-49.
- (3) Seliktar, D., Zisch, A. H., Lutolf, M. P., Wrana, J. L., y Hubbell, J. A. (2004) MMP-2 sensitive, VEGF-bearing bioactive hidrogels for promotion of vascular healing. *Journal of Biomedical Materials Research Parte A* 68A, 704-716.
- (4) Zisch, A. H., Lutolf, M. P., Ehrbar, M., Raeber, G. P., Rizzi, S. C., Davies, N., Schmokel, H. Bezuidenhout, D., Djonov, V., Zilla, P. y Hubbell, J. A. (2003) Cell-demanded release of VEGF from synthetic, biointeractive cell-growth matrices for vascularized tissue growth. *Faseb Journal* 17, 2260-+.
- (5) Ooya, T., y Yui, N. (2002) Multivalent interactions entre biotin-polirotaxane conjugates and streptavidin as a model of new targeting for transporters. *Journal of Controlled Release* 80, 219-228.
- (6) Segura, T., y Shea, L. D. (2002) Surface-tethered DNA complexes for enhanced gene delivery. *Bioconjugate Chemistry* 13, 621-629.
- (7) Schaffer, D. V., y Lauffenburger, D. A. (1998) Optimization of cell surface binding enhances efficiency and specificity of molecular conjugate gene delivery. *Journal of Biological Chemistry* 273, 28004-28009.
- (8) Thoma, G. Duthaler, R. O., Magnani, J. L. y Patton, J. T. (2001) Nanomolar E-selectin inhibitors: 700-fold potentiation of affinity by multivalent ligand presentation. *Journal of the American Chemical Society* 123, 10113-10114.
- (9) Pouyani, T. y Prestwich, G. D. (1994) Functionalized Derivatives of Hyaluronic-Acid Oligosaccharides - Drug Carriers y Novel Biomaterials. *Bioconjugate Chemistry* 5, 339-347.
- (10) York, S. J., Arneson, L. S., Gregory, W. T., Dahms, N. M. y Kornfeld, S. (1999) The rate of internalization of the mannose 6-fosfato/insulin-like growth factor II receptor is enhanced by multivalent ligand binding. *Journal of Biological Chemistry* 274, 1164-1171.
- (11) Hlavacek, W. S., Posner, R. G. y Perelson, A. S. (1999) Steric effects on multivalent ligand-receptor binding: Exclusion of ligand sites by bound cell surface receptors. *Biophysical Journal* 76, 3031-3043.
- (12) Hubble, J. (1999) A model of multivalent ligand-receptor equilibria que explains the effect of multivalent binding inhibitors. *Molecular Immunology* 36, 13-18.
- (13) Muller, K. M., Arndt, K. M. y Pluckthun, A. (1998) Model and simulation of multivalent binding to fixed ligands. *Analytical Biochemistry* 261, 149-158.
- (14) Huskens, J., Mulder, A., Auletta, T., Nijhuis, C. A., Ludden, M. J. W., y Reinhoudt, D. N. (2004) A model for describing the thermodynamics of multivalent host-guest interactions at interfaces. *Journal of the American Chemical Society* 126, 6784-6797.
- (15) Lai, K., Kaspar, B. K., Gage, F. H., y Schaffer, D. V. (2003) Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation en vitro and en vivo. *Nature Neuroscience* 6, 21-27.
- (16) Pepinsky, R. B., Rayhorn, P. Day, E. S., Dergay, A., Williams, K. P., Galdes, A., Taylor, F. R., Boriack-Sjodin, P. A. y Garber, E. A. (2000) Mapping Sonic hedgehog-receptor interactions by steric interference. *Journal of Biological Chemistry* 275, 10995-11001.
- (17) Stile, R. A. y Healy, K. E. (2001) Thermo-responsive peptide-modified hidrogels for tissue regeneration. *Biomacromolecules* 2, 185-194.
- (18) Taylor, F. R., Wen, D. Y., Garber, E. A., Carmillo, A. N., Baker, D. P., Arduini, R. M., Williams, K. P., Weinreb, P. H., Rayhorn, P. Hronowski, X. P., Whitty, A., Day, E. S., Boriack-Sjodin, A., Shapiro, R. I., Galdes, A. y Pepinsky, R. B. (2001) Enhanced potency of human sonic hedgehog by hydrophobic modification. *Biochemistry* 40, 4359-4371.
- (19) Pepinsky, R. B., Zeng, C. H., Wen, D. Y., Rayhorn, P. Baker, D. P., Williams, K. P., Bixler, S. A., Ambrose, C. M., Garber, E. A., Miatkowski, K., Taylor, F. R., Wang, E. A. y Galdes, A. (1998) Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *Journal of Biological Chemistry* 273, 14037-14045.
- (20) Pola, R., Ling, L. E., Silver, M., Corbley, M. J., Kearney, M., Pepinsky, R. B., Shapiro, R., Taylor, F. R., Baker, D. P., Asahara, T. e Isner, J. M. (2001) The morfogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nature Medicine* 7, 706-711.
- (21) Saha, K., y Schaffer, D. V. (2006) Signal dynamics en Sonic hedgehog tissue patterning. *Development* 133,

889-900.

(22) Lai, K., Robertson, M. J., y Schaffer, D. V. (2004) The Sonic hedgehog signaling system as a bistable genetic switch. *Biophysical Journal* 86, 2748-2757.

(23) Perelson, A. S. (1981) Receptor Clustering on a Cell-Surface .3. Theory de Receptor CrossLinking by Multivalent Ligands - Description by Ligy States. *Mathematical Biosciences* 53, 1-39.

(24) Lauffenburger, D. A., y Linderman, J. J. (1993) Receptors: Models for Binding, Trafficking, y Signaling.

(25) Vercruyse, K. P., Marecak, D. M., Marecek, J. F. y Prestwich, G. D. (1997) Synthesis and en vitro degradation of new polivalent hidrazida cross-linked hidrogels of hyaluronic acid. *Bioconjugate Chemistry* 8, 686-694.

(26) Bulpitt, P. y Aeschlimann, D. (1999) New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: Preparación de functionalized derivatives and their use en the formation of novel biocompatible hidrogels. *Journal of Biomedical Materials Research* 47, 152-169.

(27) Stile, R. A., Barber, T. A., Castner, D. G. y Healy, K. E. (2002) Sequential robust design methodology y X-ray photoelectron spectroscopy to analyze the grafting of hyaluronic acid to glass substrates. *Journal of Biomedical Materials Research* 61, 391-398.

(28) Shu, X. Z., Liu, Y. C., Luo, Y., Roberts, M. C. y Prestwich, G. D. (2002) Disulfide cross-linked hyaluronan hidrogels. *Biomacromolecules* 3, 1304-1311.

(29) Luo, Y., Ziebell, M. R. y Prestwich, G. D. (2000) A hyaluronic acid-taxol antitumor bioconjugate targeted to cancer cells. *Biomacromolecules* 1, 208-218.

(30) Luo, Y. y Prestwich, G. D. (1999) Synthesis and selective cytotoxicity of a hyaluronic acid-antitumor bioconjugate. *Bioconjugate Chemistry* 10, 755-763.

(31) Feng, J., White, B. Tyurina, O. V., Guner, B. Larson, T., Lee, H. Y., Karlstrom, R. O. y Kohtz, J. D. (2004) Synergistic and antagonistic roles of the Sonic hedgehog N- y C-terminal lipids. *Development* 131, 4357-4370.

(32) Torroja, C. Gorfinkiel, N. y Guerrero, I. (2004) Patched controls the Hedgehog gradient by endocytosis en a dynamin-dependent manner, but this internalization does not play a major role en signal transduction. *Development* 131, 2395-2408.

(33) Incardona, J. P., Lee, J. H., Robertson, C. P., Enga, K., Kapur, R. P., y Roelink, H. (2000) Receptor-mediated endocytosis of soluble and membrane-tethered Sonic hedgehog by Patched-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 12044-12049.

(34) Stile, R. A., Chung, E., Burghardt, W. R. y Healy, K. E. (2004) Poly(N-isopropilacrilamida)-based semiinterpenetrating polimer networks for tissue engineering applications. Effects of linear poli(acrylic acid) chains on rheology. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edición* 15, 865-878.

(35) Chung, E. H., Gilbert, M., Viridi, A. S., Sena, K., Sumner, D. R. y Healy, K. E. (2006) Biomimetic artificial ECMs stimulate bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Parte A* 79A, 815-826.

Chen, C.-H., D. P. v. Kessler, et al. (1999). "Nuclear Trafficking of Cubitus interruptus en the Transcriptional Regulation of Hedgehog Target Gene Expression." *Cell* 98: 305-316.

French, A. R. y D. A. Lauffenburger (1996). "Intracellular receptor/ligand sorting based on endosomal retention components." *Biotechnology and Bioengineering* 51(3): 281-297.

Fuse, N., T. Maiti, et al. (1999). "Sonic hedgehog protein signals not as a hidrolitic enzyme but as an apparent ligand for patched." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 10992-9.

Keller, A. D. (1995). "Model genetic circuits encoding autoregulatory transcription factors." *Journal of Theoretical Biology* 172(2): 169-185.

Lai, K., M. J. Robertson, et al. (2004). "The Sonic Hedgehog Signaling System as a Bistable Genetic Switch." *Biophysical Journal* 86: 2748-2757.

Lander, A. D., Q. Nie, et al. (2002). "Do morfogen gradients arise by diffusion?" *Dev Cell* 2(6): 785-96.

Lauffenburger, D. A. y J. J. Linderman (1993). *Receptors: Models for binding, trafficking, and signaling*. New York, Oxford University Press.

Taipale, J., M. K. Cooper, et al. (2002). "Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed." *Nature* 418: 892-7.

Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a realizaciones específicas de la misma, los expertos en la técnica deben entender que se pueden realizar diversos cambios y se pueden sustituir equivalentes. Además, se pueden hacer muchas modificaciones para adaptar una situación en particular, material, composición de materia, proceso, etapa o etapas del proceso, al objetivo de la presente invención. La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de la fórmula:



en la que X es un polipéptido biológicamente activo que tiene un peso molecular de 2 kDa a 2000 kDa y en la que X es: i) un receptor; o ii) un ligando para un receptor, en donde el ligando activa una ruta de señalización en una célula eucariota; Y es un resto enlazador opcional, en donde n es 0 o un número entero de 1 a 10; y Z es un polímero biocompatible que comprende de 50 a 100.000 subunidades,

en el que la relación molar entre el polipéptido biológicamente activo y el polímero es de 10:1 a 50:1; y en donde la CE₅₀ del polipéptido en el conjugado es al menos 2 veces menor que la CE₅₀ del polipéptido en forma soluble.

15 2. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el polímero es un polímero lineal que comprende múltiples subunidades seleccionadas de entre ácido hialurónico, ácido acrílico, etilenglicol, ácido metacrílico, acrilamida, metacrilato de hidroxietilo, manitol, maltosa, glucosa, arabinosa, taurina, betaina, celulosas modificadas, hidroxietilcelulosa, etilcelulosa, metilcelulosa, hidroxietilmetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, almidones modificados, almidón modificado hidrofóticamente, hidroxietilalmidón, hidroxipropilalmidón, amilosa, amilopectina, almidón oxidado y copolímeros de los mismos.

3. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el polipéptido biológicamente activo es un ligando para un receptor, en donde el ligando activa una ruta de señalización celular en una célula eucariótica.

25 4. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el polímero es poli(ácido acrílico) lineal.

5. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el polímero es ácido hialurónico.

30 6. El conjugado de la reivindicación 1, en el que la relación molar entre el polipéptido biológicamente activo y el polímero es de 10:1 a 25:1.

7. El conjugado de la reivindicación 1, en el que la relación molar entre el polipéptido biológicamente activo y el polímero es de 25:1 a 50:1.

35 8. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el polipéptido biológicamente activo tiene un peso molecular de 5 kDa a 100 kDa.

9. El conjugado de la reivindicación 3, en el que el polipéptido biológicamente activo se selecciona de entre un factor de crecimiento, una interleucina, una hormona del crecimiento, un factor estimulante de colonias, un interferón o un péptido neuroactivo.

45 10. El conjugado de la reivindicación 3, en el que el polipéptido biológicamente activo se selecciona de entre sonic hedgehog (Shh), proteína 4 morfogénica ósea, interleucina-3 (IL-3), factor-1 de células madre (SCF-1), ligando de tirosina cinasa 3 de tipo fms (Flt3), factor inhibidor de la leucemia (LIF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), factor de crecimiento neural (NGF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4 (NT-4), neurotrofina-5 (NT-5), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y proteasa nexina-1.

50 11. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el polipéptido biológicamente activo es un receptor.

12. El conjugado de la reivindicación 11, en el que el polipéptido biológicamente activo es un receptor de unión a TNF- α , un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, un receptor de interleucina, un receptor de neurotransmisor o EphB2.

55 13. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la CE₅₀ del polipéptido en el conjugado es al menos 5 veces o al menos 10 veces menor que la CE₅₀ del polipéptido en forma soluble.

14. Una composición farmacéutica que comprende:

- 60 a) el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13; y
b) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15. Un dispositivo implantable que comprende el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

65 16. El dispositivo implantable de la reivindicación 15, en donde el dispositivo implantable es una endoprótesis vascular, una derivación, una válvula artificial, una derivación, una articulación artificial, un injerto o un electrodo.

17. Un dispositivo de administración de fármacos implantable que comprende el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

5 18. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, el dispositivo implantable de las reivindicaciones 15 o 16, o el dispositivo de administración de fármacos implantable de la reivindicación 17, para su uso en un procedimiento de tratamiento que comprende administrar dicha composición o dicho dispositivo a un individuo.

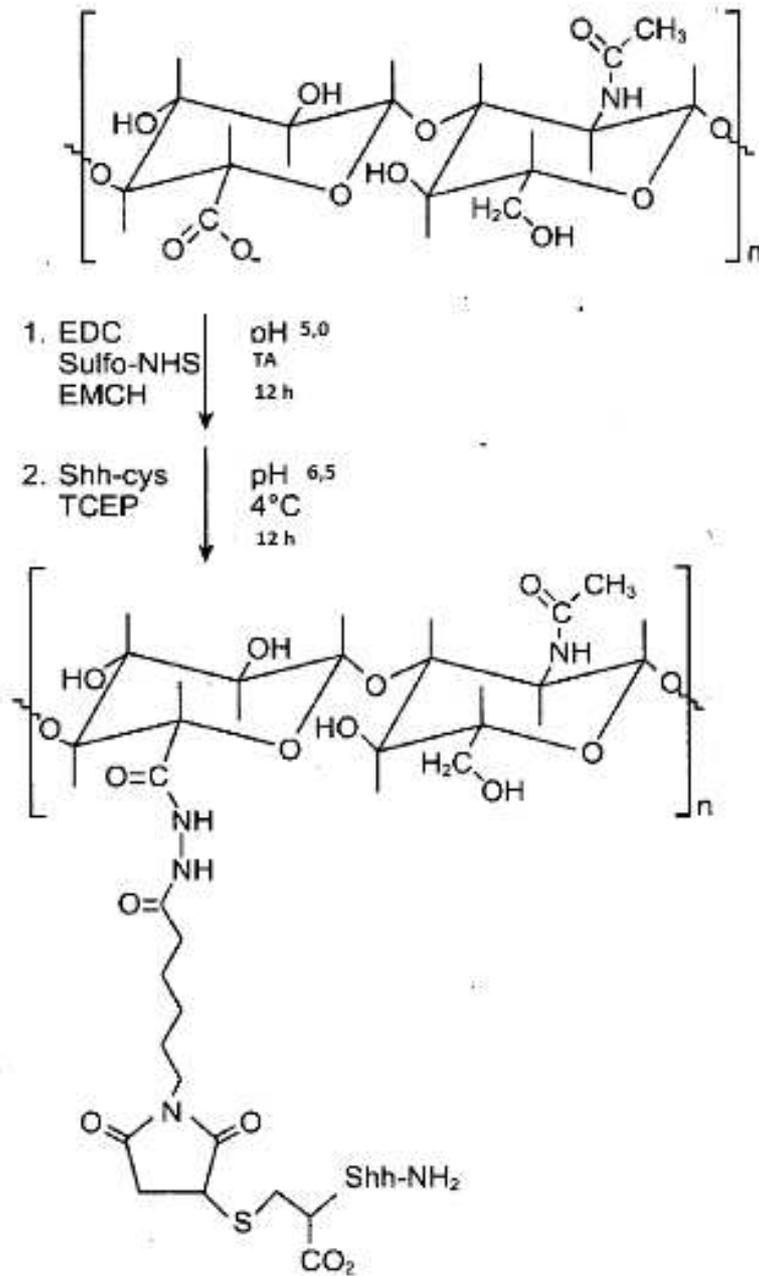


FIG. 1

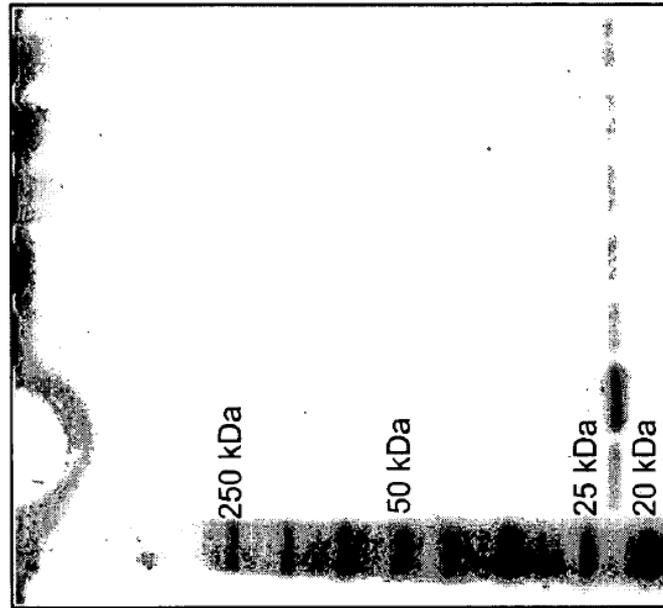


FIG. 2B

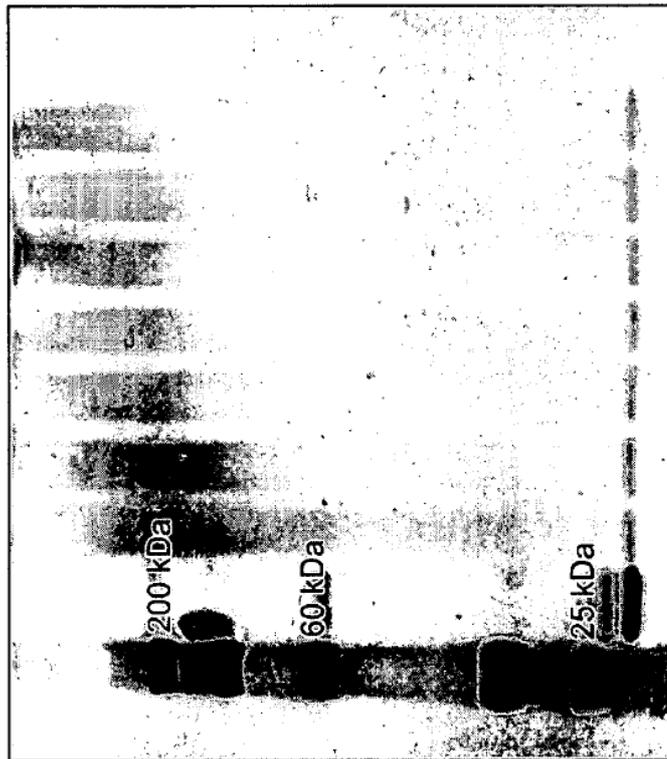


FIG. 2A

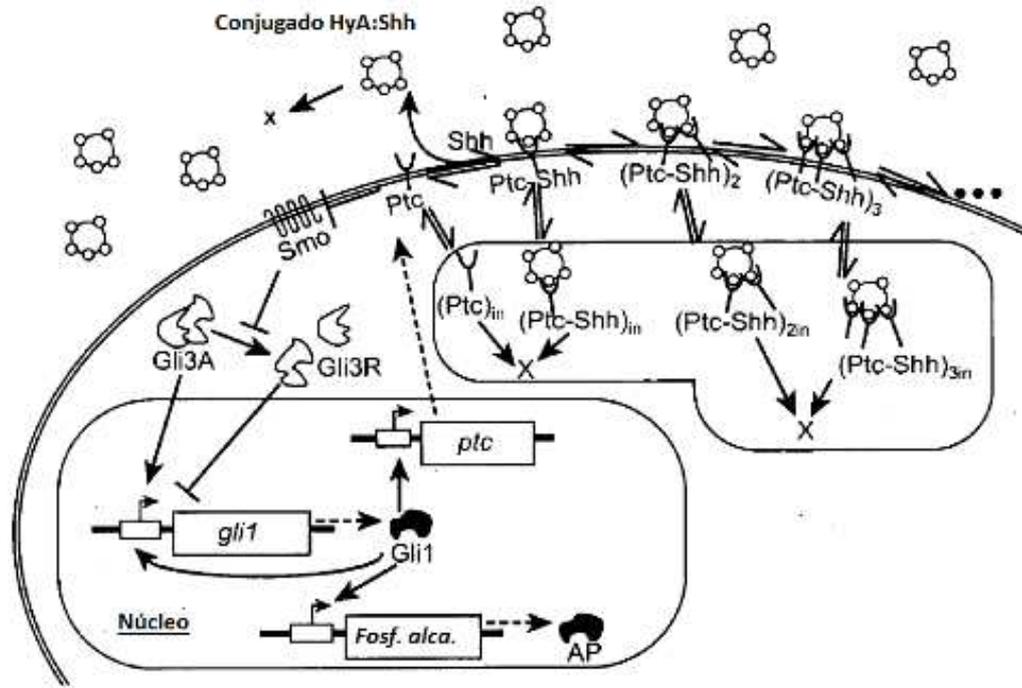


FIG. 3

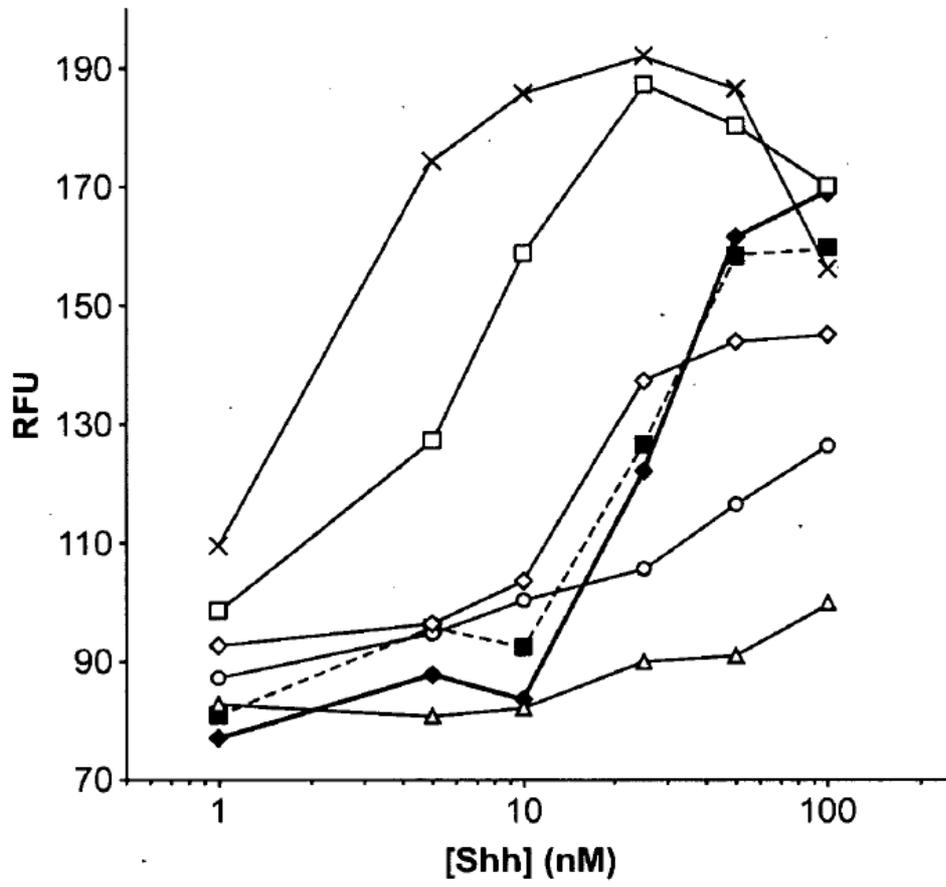


FIG. 4

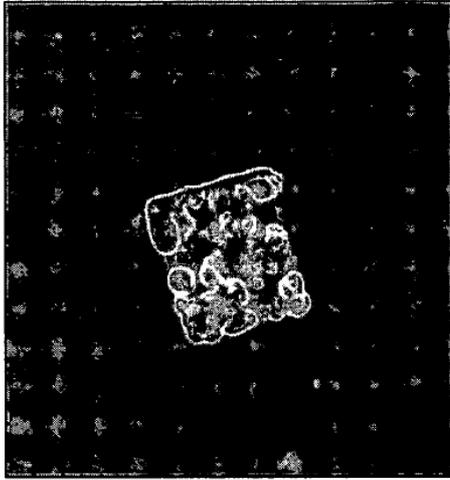


FIG. 5C



FIG. 5B

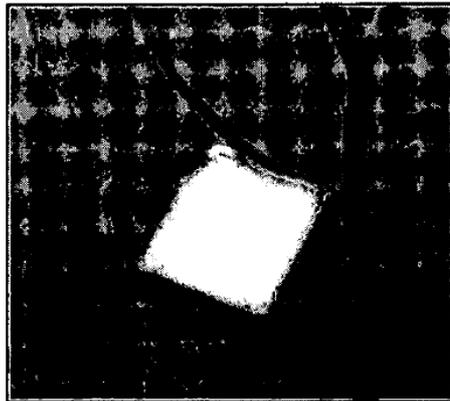


FIG. 5A

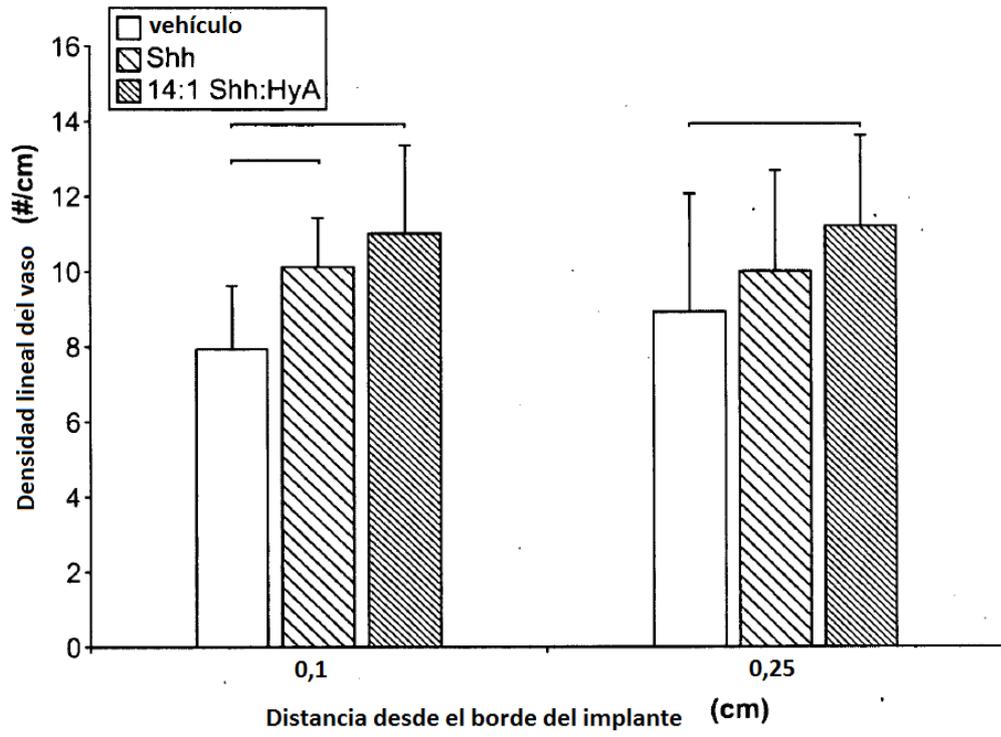


FIG. 6

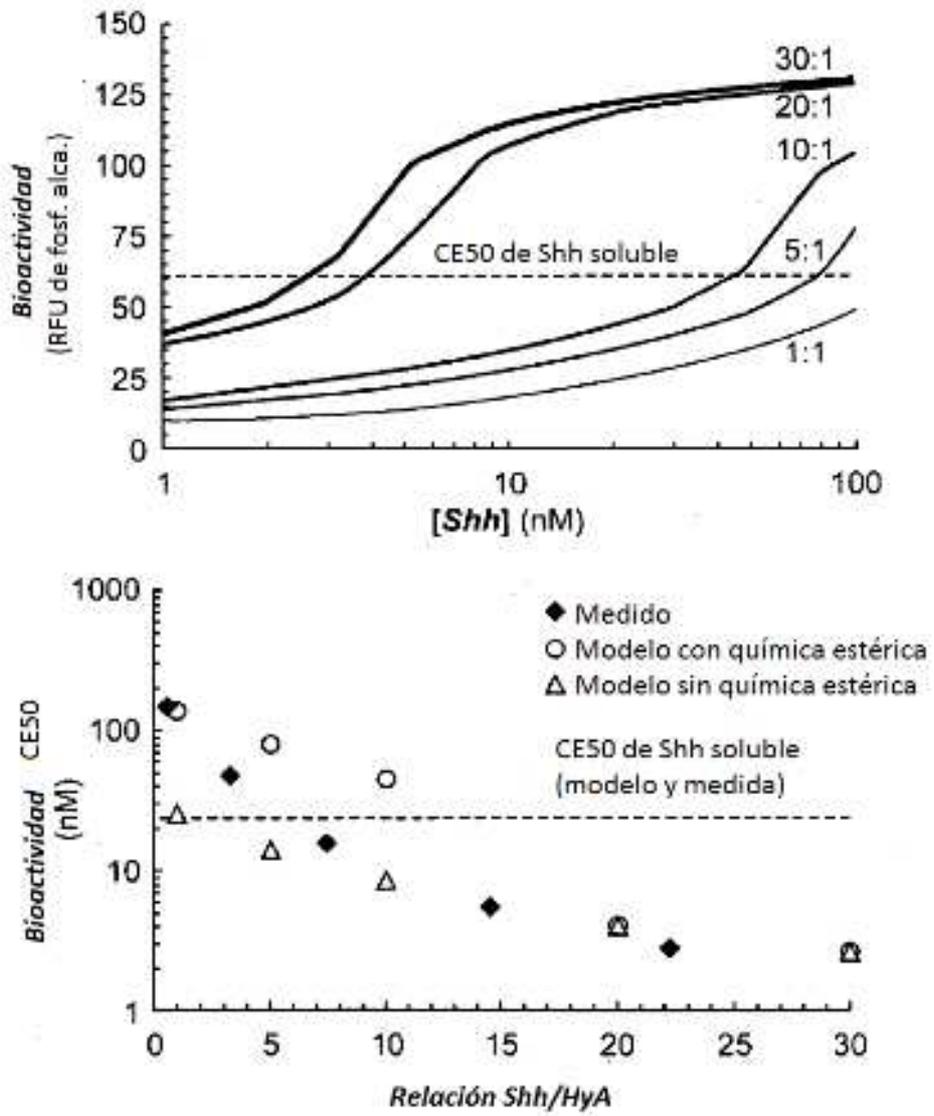


FIG. 7