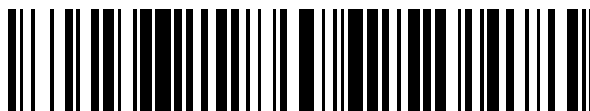


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 884**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/14** (2006.01)

**A61K 47/34** (2007.01)

**A61K 47/58** (2007.01)

**A61K 47/61** (2007.01)

**A61K 47/64** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2010 PCT/US2010/048145**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2011 WO11031771**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2010 E 10816024 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 2475358**

54 Título: **Composición de núcleo aniónico para suministro de agentes terapéuticos y métodos de preparación y uso de la misma**

30 Prioridad:

**09.09.2009 US 240857 P**

**09.09.2009 US 241004 P**

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

**12.12.2019**

73 Titular/es:

**PHARMAIN CORPORATION (100.0%)**

**720 Broadway Suite 511**

**Seattle, WA 98122, US**

72 Inventor/es:

**CASTILLO, GERARDO, M.;**

**BOLOTIN, ELIJAH, M. y**

**NISHIMOTO-ASHFIELD, AKIKO**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**Observaciones:**

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

**ES 2 734 884 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

Composición de núcleo aniónico para suministro de agentes terapéuticos y métodos de preparación y uso de la misma

### 5 Referencia cruzada

La presente solicitud reivindica beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos 61/240857 presentada el 9 de septiembre de 2009 y la Solicitud Provisional de los Estados Unidos 61/241004 presentada el 9 de septiembre de 2009.

10

### Declaración con respecto a investigación patrocinada por la Administración federal

La presente invención se realizó con el apoyo del gobierno de los Estados Unidos según el número de contrato 1 R43 AI078539 por el Instituto Nacional de Envejecimiento y Enfermedades Infecciosas (NIAID) y 1R43DK084724 por el Instituto Nacional de la Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales (NIDDK). La Administración de los Estados Unidos puede tener ciertos derechos en la materia objeto proporcionada en el presente documento.

15

### Antecedentes de la invención

20 El desarrollo de nuevos fármacos, formulaciones y otros sistemas para administración de péptidos y proteínas fisiológicamente activos y proteínas y otros productos terapéuticos y materiales está conducido por la necesidad de proporcionar estos péptidos o proteínas u otros materiales para conseguir los efectos fisiológicos deseables. Con respecto a péptidos y proteínas, se ha observado que muchos de ellos son inestables en el tracto gastrointestinal y por lo tanto pueden necesitar estabilizarse o protegerse o suministrarse mediante circulación sistémica. Además, los péptidos y proteínas que tienen masas moleculares bajas tienden a tener semividas biológicas cortas debido a su retirada eficaz de la circulación sistémica a través de los riñones y el sistema reticuloendotelial. Muchos péptidos y proteínas también pierden su actividad *in vivo* debido a la proteólisis (escisión de enlaces peptídicos).

25

30 En parte para superar estos efectos indeseables, puede usarse un sistema de suministro farmacológico. Se han desarrollado estrategias de suministro farmacológico para el suministro de péptidos y proteínas *in vivo*, pero la mayoría no son útiles para suministro prolongado. Por ejemplo, el uso de una infusión sistémica continua de fármaco mediante una bomba es poco práctica para pacientes externos que requieran altos niveles de movilidad. La infusión tiene las desventajas asociadas de calidad de vida e infecciones potenciales de la vía intravenosa (*i.v.*). El uso de una bomba implantable, comprendida por una cápsula con una membrana que permite la difusión de un fármaco, está limitado por el volumen de la cápsula. Se usan con frecuencia péptidos y proteínas en formulaciones concentradas en las cápsulas y se agregan, perdiendo de este modo actividad específica. En muchos casos, el fármaco se libera al espacio extracelular y se distribuye en el sistema linfático. Otros sistemas de suministro biodegradables implantables se implantan o inyectan en la epidermis. Los componentes del sistema se degradan habitualmente de forma lenta como resultado de la actividad biológica de las células circundantes (es decir como resultado de la liberación de enzimas que degradan enlaces químicos que mantienen estos implantes unidos).

35

40

45 Las proteínas que tienen una carga neta positiva en su superficie en condiciones fisiológicas y tienen un punto isoeléctrico (pI) básico (mayor de pH 7,5) se beneficiarán de la composición de la presente invención. El uso de proteínas básicas tiene mucho potencial terapéutico, incluyendo usos en el tratamiento del cáncer y enfermedades neoplásicas relacionadas, infecciones sistémicas, inflamaciones y enfermedades del sistema nervioso tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedades priónicas. Existe la necesidad de un vehículo de suministro farmacológico biodegradable para el suministro sistémico de proteínas y péptidos básicos (pI mayor de pH 7,5) que proporcionarán circulación más larga en el cuerpo, más estabilidad en la sangre y pueden administrarse más convenientemente. En una realización de la presente invención el agente antiinfeccioso que se beneficia del vehículo de la presente invención es lisostafina con pI de 9,56. La mayoría de péptidos y fármacos que pueden ser potencialmente útiles *in vivo* en el bloqueo de un mecanismo intracelular específico requieren restos básicos tales como grupos amino que permiten la internalización de membrana. Uniendo restos básicos, estos péptidos y fármacos de acción intracelular pueden penetrar las membranas biológicas. Estos restos básicos se denominan en ocasiones de forma colectiva resto penetrante celular o péptidos penetrantes celulares (Cell-Penetrating Peptides por Ulo Langel, Pharmacology & Toxicology Series, 2002, CRC Press, Nueva York).

50

55

### Sumario de la invención

60 La materia objeto de la presente invención se define en las reivindicaciones 1-15 adjuntas. Las realizaciones descritas en el presente documento que no están abarcadas por las reivindicaciones sirven únicamente para ilustrar el contexto técnico de la invención.

60

65 En un aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende una cadena principal polimérica que comprende polilisina, poliornitina, poliarginina, poliglutamato, poliaspartato, policisteína, poliserina, politreonina, politirosina, heparina, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de heparano, sulfato de queratano, carragenina, pectina, fucoidano o dextrano; múltiples cadenas protectoras, en donde cada cadena protectora

65

comprende poli(etilenglicol) y está unida covalentemente con la cadena principal polimérica por un enlace simple; y grupos aniónicos de carboxilato, sulfato, sulfonato o fosfato unidos covalentemente con una unidad monomérica de la cadena principal polimérica y una molécula de carga unida electrostáticamente con el grupo aniónico directamente sin iones intermediarios (tales como metales), en donde dicha interacción electrostática es una interacción iónica. En un aspecto, los átomos de azufre y/o fósforo de grupos aniónicos están a más de un átomo de distancia entre sí para minimizar la propiedad quelante. La molécula de carga comprende: i) un péptido penetrante celular, ii) un dominio de unión aniónico o iii) un punto isoeléctrico mayor de 7,3. Se entiende que la interacción electrostática de la molécula de carga con la composición de la presente invención es el principal modo de interacción ( $K_d$  de  $10 \mu\text{M}$ ) y cualquier interacción hidrófoba mínima, cuando esté presente, es débil ( $K_d > 10 \mu\text{M}$ ) e insignificante. Para el fin de la presente memoria descriptiva la expresión "dominio de unión aniónico" es cualquier parte de una molécula que tenga átomos de nitrógeno con carga positiva de modo que las moléculas puedan unirse con restos de carboxilato, sulfato, sulfonato o fosfato con una constante de disociación menor de  $10 \mu\text{M}$ . En un aspecto relacionado, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cadena principal polimérica que comprende unidades monoméricas, una cadena protectora unida covalentemente con la cadena principal polimérica y grupos aniónicos de carboxilato, sulfato, sulfonato o fosfato unidos covalentemente con una unidad monomérica de la cadena principal polimérica y una molécula de carga unida electrostáticamente directamente sin iones intermediarios (tales como metales) con el grupo aniónico con un excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde los átomos de azufre y/o fósforo de grupos aniónicos cuando están presentes están a más de un átomo de distancia entre sí, y en donde la molécula de carga comprende: i) un péptido penetrante celular, ii) un dominio de unión aniónico o iii) un punto isoeléctrico mayor de 7,3. Se ha descubierto que los polímeros que contienen moléculas quelantes pueden unirse con péptidos/proteínas de unión a metales en ausencia de metales intermediarios. Sin desear quedar ligado a la teoría, la retirada de la capacidad de moléculas quelantes para quelar metales por derivatización de los grupos carboxilo con un resto negativo de forma similar pero no quelante (tal como sulfato, sulfonato y fosfato) indica que la capacidad para unirse con péptidos y proteínas es mediante interacciones iónicas.

Estas realizaciones de la presente invención, otras realizaciones y sus elementos y características, resultarán evidentes a partir de la descripción, los dibujos y las reivindicaciones a continuación.

### Breve descripción de los dibujos

Determinados elementos de la invención se exponen de forma particular en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá un mejor entendimiento de los elementos y ventajas de la presente invención mediante referencia a la siguiente descripción detallada que se expone realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de los que:

La Figura 1 representa un ejemplo de una de las composiciones de núcleo aniónico de la presente invención. La invención representa una composición con cadena principal polimérica y una molécula de carga catiónica o péptido/proteína básico unido de forma electrostática directamente con el grupo aniónico del vehículo. Este diagrama ilustrativo representa una cadena principal polimérica con: a) cadenas protectoras unidas de forma covalente y colgantes, b) grupos aniónicos unidos covalentemente y colgantes procedentes de grupos carboxilato, sulfato, sulfonato o fosfato, en donde los grupos aniónicos a su vez interaccionan de forma electrostática directamente (sin iones intermediarios) con la molécula de carga catiónica o el péptido/proteína básico (punto isoeléctrico mayor de 7 pero preferentemente mayor de 7,3 y más preferentemente mayor de 7,5). Este diagrama no limita las composiciones contempladas por la presente invención.

### Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

Por conveniencia, antes de la descripción adicional de la presente invención, se recogen aquí determinados términos empleados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas que necesitan explicaciones adicionales. Estas definiciones deberían interpretarse a la luz del resto de la divulgación y entenderse como lo haría un experto en la materia. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto habitual en la materia.

Los artículos "un" y "una" se usan para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. Como ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

La expresión "proteína básica" es una proteína cuyo punto isoeléctrico es básico (por encima de 7), que se denomina una "proteína básica" mientras que una proteína cuyo punto isoeléctrico es ácido (por debajo de 7) se denomina una "proteína ácida". La solubilidad de las proteínas es menor en el punto isoeléctrico. Las proteínas tienen grupos ionizables tales como grupos carboxilo y grupos amino. Ya que la carga de estos grupos depende del pH, una molécula proteica puede tener diferentes cargas según el pH. El número de cargas negativas es el mismo que el número de cargas positivas a un valor de pH específico y este pH es el punto isoeléctrico, por lo tanto, la repulsión electrostática entre proteínas similares es menor en este punto y la solubilidad también es menor. Sin embargo, por ejemplo, a pH por debajo del punto isoeléctrico los grupos amino obtendrán protones extra haciendo que la proteína obtenga cargas

positivas extra o los grupos carboxilo se protonarán haciendo que la proteína pierda cargas negativas en comparación con la carga en el punto isoelectrónico. La determinación de si la protonación de los grupos amino o carboxilo es responsable de los cambios en la propiedad de la proteína tras la acidificación depende del pH del punto isoelectrónico de partida. La acidificación de proteína básica, con punto isoelectrónico por encima de 8,0, hacia pH neutro, el grupo principal que cambiará será el grupo amino. La acidificación adicional por debajo de pH 7 dará como resultado protonación del grupo carboxilo haciéndolo neutro y por tanto haciendo la carga neta global de la proteína más positiva. Todas las proteínas básicas tendrán más cargas positivas que cargas negativas a pH neutro haciéndolas capaces de unirse con el vehículo aniónico de la presente invención a pH neutro. Debido a que los grupos carboxilo pueden perder carga negativa a pH entre 5 y 7, el grupo aniónico preferido de vehículo de la presente invención es el grupo sulfato, sulfonato y fosfato que requiere pH entre 2 y 5 antes de perder cargas negativas. Los grupos carboxilo también serán útiles, sin embargo en múltiples ocasiones los grupos carboxilo agrupados entre sí tenderán a captar iones metálicos con carga positiva haciendo la carga neta global en presencia de metal más cercana a neutra o menos aniónica. Cuanto mayor sea el número de sitios aniónicos en el vehículo menos probable es que los metales interfieran con su capacidad para unirse con moléculas de carga con carga positiva.

El término "vehículo" para el fin de la presente invención se refiere a una composición de la presente invención que comprende una cadena principal polimérica con restos aniónicos y una cadena protectora unida covalentemente.

La expresión "cadena principal" para el fin de la presente invención se refiere a la estructura que comprende un polímero (lineal o ramificado).

El término "derivado" o "análogo" como se usa en el presente documento incluye compuestos cuyas estructuras de núcleo son las mismas que, o se asemejan estrechamente a la de, un compuesto parental, pero que tienen una modificación química o física, tal como grupos diferentes o adicionales; el término incluye copolímeros de compuestos parentales que pueden unirse a otros átomos o moléculas. El término también incluye un péptido o proteína con al menos 50 % de identidad de secuencia con el péptido o proteína parental. El término también incluye un péptido con grupos adicionales unidos a él, tales como marcador o etiqueta adicional, en comparación con el péptido parental. El término también incluye un polímero con grupo adicional unido a él, tal como un grupo alcoxi o metoxi, en comparación con el polímero parental.

El "punto isoelectrónico" (pI), en ocasiones abreviado a IEP, es el pH al que una molécula o superficie particular no porta carga eléctrica neta. Moléculas anfotéricas denominadas iones dipolares contienen cargas tanto positivas como negativas dependiendo de los grupos funcionales presentes en la molécula. La carga neta en la molécula está afectada por el pH de su ambiente circundante y puede adquirir más carga positiva o negativa debido a la pérdida o ganancia de protones (H<sup>+</sup>). El pI es el valor de pH al que la molécula no porta carga eléctrica o las cargas negativas y positivas son iguales. Las superficies adquieren carga de forma natural para formar una doble capa. En el caso habitual cuando los iones determinantes de carga de superficie son H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup>, la carga de superficie neta está afectada por el pH del líquido en el que se sumerge el sólido. De nuevo, el pI es el valor de pH de la solución al que la superficie no porta ninguna carga neta. El valor de pI puede afectar a la solubilidad de una molécula a un pH dado. Dichas moléculas tienen solubilidad mínima en soluciones acuosas o salinas al pH que corresponde a su pI y con frecuencia precipitan fuera de la solución. Las moléculas anfotéricas biológicas tales como proteínas contienen grupos funcionales tanto ácidos como básicos. Los aminoácidos que componen proteínas pueden tener naturaleza positiva, negativa, neutra o polar, y juntos proporcionan a una proteína su carga global. A un pH por debajo de su pI, las proteínas portan una carga neta positiva; por encima de su pI portan una carga neta negativa. Las proteínas pueden separarse de este modo según su punto isoelectrónico (carga global) en un gel de poli(acrilamida) utilizando la técnica denominada isoelectroenfoque, que usa un gradiente de pH para separar proteínas. El isoelectroenfoque también es la primera etapa en una electroforesis en gel de poli(acrilamida) de gel bidimensional. Para un aminoácido con solamente un grupo amina y uno carboxilo, el pI puede calcularse a partir del pKa de esta molécula usando una fórmula:  $pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$ . Para aminoácidos con más de dos grupos ionizables, tales como lisina, se usa la misma fórmula, pero esta vez los dos pKa usados son los de los dos grupos que pierden y ganan una carga desde la forma neutra del aminoácido. La lisina tiene un único pKa carboxílico y dos valores pKa de amina (uno de los cuales está en el grupo R), de modo que la lisina completamente protonada tiene una carga neta +2. Para obtener una carga neutra, se puede desprotonar la lisina dos veces, y por lo tanto usar los valores de pKa del grupo R y amina (hallados en la Lista de aminoácidos convencionales):  $pI = \frac{9,06 + 10,54}{2} = 9,80$ . En un polipéptido, los grupos amino y carboxilo alfa no son ionizables y por tanto no se calculan excepto en el extremo. En este caso solamente los grupos R (principalmente lisina, arginina, aspartato y glutamato) son los más relevantes en el cálculo del pI. El pH de un gel electroforético se determina mediante el tampón usado para ese gel. Si el pH del tampón está por encima del pI de la proteína que se procesa, la proteína migrará al polo positivo (la carga negativa es atraída a un polo positivo). Si el pH del tampón está por debajo del pI de la proteína que se procesa, la proteína migrará al polo negativo. Si la proteína se procesa con un pH de tampón que es igual al pI, esta no migrará en absoluto. Esto también sucede para aminoácidos individuales. Para el fin de la presente invención, el pI por encima de 7 se denomina proteína básica, pero el pI más preferido para la molécula de carga de la presente invención está por encima del pH fisiológico de 7,3 ya que estas moléculas de carga tienen una carga neta positiva a pH fisiológico. Debería enfatizarse que para una molécula de carga grande tal como proteína, el pI básico no es el único requisito para cargar en el vehículo ya que la existencia de parcelas de superficie o carga positiva es suficiente para permitir una interacción electrostática fuerte con el vehículo.

La expresión "molécula de carga" es el agente activo, agente terapéutico o agente de captura de imágenes que se pretende suministrar mediante la composición de núcleo aniónico o el vehículo de la presente invención al sujeto. Se pretende que la molécula de carga esté unida electrostáticamente directamente con los grupos aniónicos del vehículo pero no esté unida covalentemente con el vehículo. La molécula de carga puede ser un péptido o proteína que contiene grupos amino con carga positiva a pH neutro. El agente activo también incluye una molécula orgánica con carga positiva pequeña.

La expresión "de origen natural" o "nativo", cuando se aplica a un objeto, se refiere al hecho de que un objeto puede hallarse en la naturaleza. Por ejemplo, una cadena principal que puede aislarse de una fuente de la naturaleza y que no se ha modificado de forma intencionada, por ejemplo, en el laboratorio, es de origen natural. La expresión "de origen no natural" o "no nativo" o "sintético" se aplica a un objeto que se ha modificado de forma intencionada, por ejemplo, en el laboratorio, y no hallado normalmente en la naturaleza.

El término "polímero" es una molécula (o macromolécula) compuesta de unidades estructurales repetidas conectadas por enlaces químicos covalentes. Este término incluye poliaminoácidos (con aminoácidos repetidos; obsérvese que para el fin de la presente memoria descriptiva, las proteínas no tienen aminoácidos repetidos ya que sus aminoácidos varían a lo largo de la cadena), polialiamina, ácido poliacrílico, polietilimina, polisacáridos y otras cadenas principales poliméricas mencionadas en la presente memoria descriptiva. Para mayor claridad de la presente memoria descriptiva, la expresión "cadena principal polimérica" o "polímero de cadena principal" es un polímero no proteico. Proteico significa proteínas de origen natural o sus derivados que no son un homopolímero y tienen actividad enzimática o biológica provocada por su conformación tridimensional. El homopolímero de poliaminoácido tal como polilisina no es proteico.

Un "paciente", "sujeto" u "hospedador" para tratar con la composición de la presente invención puede significar un ser humano o animal no humano. El término "mamífero" se conoce en la técnica y los mamíferos ejemplares incluyen seres humanos, primates, bovinos, porcinos, caninos, felinos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas).

El término "péptido/proteína" significa péptido o proteína donde el péptido tiene 50 o menos aminoácidos y la proteína tiene más de 50 aminoácidos y puede aislarse de células o prepararse de forma sintética. También pueden aislarse o prepararse de forma sintética derivados y fragmentos. Idealmente, la molécula de carga peptídica/proteica de la presente invención tendrá un punto isoeléctrico por encima de pH 7. Es posible, sin embargo, que determinados derivados de un agente activo peptídico/proteico pueda tener parcelas de grupos con carga positiva a pesar de tener un punto isoeléctrico ácido que permite la interacción de este tipo de péptido/proteína con los grupos aniónicos del vehículo. Se pretende que este tipo de molécula de carga esté abarcada por la presente invención. Un derivado de agente activo puede generarse mediante el truncamiento de la secuencia de aminoácidos o la adición de otros aminoácidos o grupos funcionales.

### Introducción general

Las realizaciones de la presente invención están dirigidas a sistemas de suministro de proteínas básicas basados en vehículos que comprenden una cadena principal, un dominio aniónico unido covalentemente a la cadena principal y una proteína básica unida por enlaces iónicos o unida de forma electrostática al dominio aniónico del vehículo. La cadena principal contiene múltiples cadenas de polietilenglicol para cubrir o proteger la proteína básica. Las cadenas de polietilenglicol protectoras pueden aumentar el radio hidrodinámico global del agente macromolecular que puede dar como resultado circulación prolongada en la sangre (no permitiendo la eliminación/filtración a través del riñón) y aumentar la retención/acumulación en sitios de alta permeabilidad vascular.

Los vehículos de la presente invención atraviesan barreras vasculares degradadas o anómalas con permeabilidad aumentada pero debido al tamaño del vehículo y la dirección del flujo/presión, el vehículo no es capaz de fluir en sentido contrario en la circulación. Esto da como resultado acumulación de vehículo en sitios de barreras vasculares anómalas. Esto se demostró en un modelo de inflamación bacteriana del tejido muscular en ratas inducidas con *E. coli*. Como alternativa, el vehículo podría usarse para la detección temprana de filtración al espacio extravascular y dirección específica a los sitios con permeabilidad vascular aumentada, tal como inflamación. Por tanto, el aumento de la acumulación del vehículo en sitios de inflamación permitirá que la proteína básica asociada a vehículos se acumule en sitios de infección.

La asociación de una proteína básica o un derivado de la misma a la cadena principal se consiguen usando una interacción iónica. El uso de proteína modificada o proteína derivatizada añadiendo restos de aminoácidos básicos puede mantener o potenciar la interacción iónica. Una ventaja de los grupos aniónicos en los vehículos de la presente invención es proporcionar unión reversible de proteínas básicas que son capaces de formar enlaces iónicos con el resto aniónico del vehículo. El enlace iónico permite la disociación reversible de proteínas/péptidos básicos y fármacos de la cadena principal que contienen los grupos funcionales aniónicos.

La formulación de vehículo-resto aniónico-proteína básica puede proporcionar varios beneficios. Por ejemplo, dichas formulaciones proporcionan mejor biocompatibilidad; reducen la toxicidad potencial; reducen la inmunogenicidad; aumentan el tiempo de permanencia en sangre; permiten la acumulación específica de sitio en sitios de inflamación.

Los vehículos de la presente invención también tienen alta capacidad de carga farmacológica, con su unión reversible específica de una proteína básica ejemplar, lisostafina (Ej. 44).

5 Basándose en los resultados presentados, las proteínas básicas se unen con el resto quelante en ausencia de metal. Las interacciones también pueden facilitarse posiblemente mediante interacciones con cadenas protectoras y/u otros componentes del vehículo. El diseño de los vehículos de la presente invención se realiza de tal modo que la proteína básica asociada de forma iónica esté protegida por las cadenas protectoras (cadenas de polietilenglicol) de, por ejemplo, peptidasas y anticuerpos. Además, la asociación de proteínas básicas (tales como lisostafina) y péptidos (tales como los presentados en la Tabla 1 y sus análogos o derivados) con el vehículo de alto peso molecular pueden  
10 prolongar la semivida *in vivo* evitando la eliminación mediante ultrafiltración renal, la captación mediante células presentadoras de antígenos y captación mediante el sistema reticuloendotelial.

### Elementos del vehículo de la invención y proteínas básicas

15 Los vehículos de la presente invención están comprendidos por: una cadena principal polimérica que comprende polilisina, poliornitina, poliarginina, poliglutamato, poliaspartato, policisteína, poliserina, politreonina, politirosina, heparina, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de heparano, sulfato de queratano, carragenina, pectina, fucoidano o dextrano capaz de apoyar múltiples grupos aniónicos derivados de grupos carboxilo, sulfato, sulfonato o fosfato que pueden unirse (mediante interacción iónica) con nitrógeno con carga positiva en un agente activo o  
20 molécula terapéutica (o molécula de carga). La cadena principal comprende además múltiples cadenas protectoras unidas covalentemente con la cadena principal polimérica mediante un único enlace. En un aspecto, el vehículo es biocompatible. Los componentes individuales se describen a continuación.

#### a. Cadenas principales

25 Las cadenas principales de los vehículos de la presente invención pueden ser polímeros y copolímeros de estructura lineal o ramificada o conjugados de los mismos. El peso molecular de la cadena principal varía de 1.000 Da a 200.000 Da. En algunas realizaciones el peso molecular de la cadena principal puede variar de 1.500 Da a 100.000 Da, o de 2.000 Da-50.000 Da, o de 2.000 Da-30.000 Da, o de 2.000 Da-25.000 Da. Es preferible que la cadena principal polimérica proceda de un polímero de origen natural. También es preferible que la cadena principal polimérica sea hidrosoluble.  
30

##### 1) Cadenas principales poliméricas o copoliméricas:

35 Los polímeros están compuestos de unidades estructurales repetidas conectadas por enlaces químicos covalentes. Un copolímero es un polímero derivado de dos o más polímeros diferentes unidos entre sí.

En determinadas realizaciones, los polímeros de cadena principal o copolímeros de cadena principal de las composiciones tienen pesos moleculares que varían de aproximadamente 500 a 5.000, 10.000, 15.000, 20.000, 25.000, 30.000, 40.000 o 50.000, 60.000, 70.000, 80.000, 90.000 o 100.000 Daltons e incluso más específicamente entre 2.000 y 50.000 Daltons. Los pesos moleculares en promedio en número (Mn) también pueden variar ampliamente, pero en general quedan en el intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 120.000 Daltons o incluso de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 70.000 o incluso de aproximadamente 3.000 a 50.000 Daltons. En determinadas realizaciones, el Mn varía entre aproximadamente 5.000 y 45.000 Daltons. Dentro  
45 de una muestra dada de una cadena principal polimérica objeto, puede estar presente un amplio intervalo de pesos moleculares. Por ejemplo, las moléculas dentro de la muestra pueden tener pesos moleculares que difieren en un factor de 2, 5, 10, 20, 50, 100 o más, o que difieren del peso molecular promedio en un factor de 2, 5, 10, 20, 50, 100 o más. El número de monómeros en el polímero de cadena principal puede variar de 10 (un 10-mero) a 1.000 (un 1.000-mero). El polímero de cadena principal puede ser como alternativa aproximadamente 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 450-mero, y aún más específicamente entre un 100-mero a 250-mero. El número de monómeros en la cadena principal polimérica determina en general el número de grupos funcionales que pueden modificarse para aportar restos aniónicos o cadenas protectoras. El tamaño preferido de las cadenas principales poliméricas se selecciona de modo que el diámetro hidrodinámico global de la molécula vehículo (cadena principal, grupos aniónicos y cadenas protectoras) antes de la carga con molécula de carga básica esté por debajo de 100 nm.  
50

55 En algunas realizaciones, la cadena principal polimérica es un homo o heteropolímero no proteico con grupos monoméricos repetidos que contienen grupos amino, carboxilo, hidroxilo y tiol y pueden ser de origen natural o sintético, en donde los grupos monoméricos repetidos pueden modificarse covalentemente para contener adicionalmente grupos aniónicos o más grupos aniónicos tales como restos carboxilato, sulfato, sulfonato o fosfato y cadenas protectoras hidrófilas. El sulfato, sulfonato o fosfato puede unirse al polímero directamente o usando un espaciador con múltiples grupos carboxilo, tales como ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido etilendiamintetraacético (DTPA), ácido nitrilotriacético (NTA), ácido etilenglicoltetraacético (EGTA) o ácido cítrico por nombrar algunos, que permitirán la unión conveniente y/o el agrupamiento de cargas aniónicas como un único colgante en la cadena principal polimérica (que no es parte de la cadena principal que es importante para la integridad molecular de la cadena principal). La cadena principal puede modificarse para portar uno o más grupos aniónicos colgantes. En  
60 otras realizaciones la cadena principal polimérica también puede ser un homo o heteropolímero no proteico con grupos  
65

hidrófobos repetidos con grupos amino, carboxilo, hidroxilo y tiol terminales o cualquier grupo funcional modificable que pueda modificarse covalentemente para contener adicionalmente un agrupamiento (dos o más) de grupos aniónicos tales como restos carboxilato, sulfato, sulfonato o fosfato y cadenas protectoras hidrófilas. La expresión "poliaminoácido no proteico" como se usa en el presente documento incluye un poliaminoácido que no es hecho de forma natural por un organismo vivo a menos que se modifique por ingeniería genética de forma recombinante o no tenga actividad enzimática o biológica resultante de su conformación tridimensional. En determinadas realizaciones, la cadena principal polimérica es un poliaminoácido que puede tener quiralidad D o L o ambas y es un homopolímero de cadena sencilla. Los homopolímeros de cadena sencilla incluyen polilisina, poliornitina, poliarginina, poliglutamato, poliaspartato, poliserina, politirosina o cualquier otro homopolímero unido a amida hecho de aminoácidos. Los homopolímeros hidrófobos de cadena sencilla comprenden poliamina, polivalina, polileucina, poliisoleucina, poliglicina o polifenilalanina. Estos poliaminoácidos hidrófobos pueden modificarse en un extremo para contener un agrupamiento (2 o más) de grupos aniónicos tales como carboxilato, sulfato, sulfonato o fosfato, o combinación de los mismos, y en el otro extremo para contener cadenas protectoras hidrófilas. Si la cadena principal es un polímero que comprende poliaminoácidos, este es habitualmente no proteico, lo que significa que no es una proteína de origen natural con actividad asociada con su conformación tridimensional. La cadena principal polimérica puede tener un peso molecular de aproximadamente 600-1.000.000 Daltons, incluyendo el intervalo de aproximadamente 1.000-70.000 Daltons. También pueden usarse otras cadenas principales poliméricas con grupos funcionales modificables repetidos tales como las que tienen grupos sulfhidrilo (tiol), amino, carboxilo e hidroxilo repetidos. También pueden usarse como la cadena principal polimérica polímeros de carbohidratos de fuente biológica y otros polímeros sintéticos donde los monómeros no son biológicos. La cadena principal polimérica proporciona múltiples sitios a partir de los que pueden unirse los grupos aniónicos y cadenas protectoras hidrófilas. La cadena principal incluye las que tienen carboxilato, sulfato, sulfonato o fosfato ya presentes y de modo que después de la unión covalente de cadenas protectoras hidrófilas tales como polietilenglicol o derivados, puede no ser necesaria ninguna modificación adicional. Estos incluyen polisacáridos sulfatados tales como sulfato de condroitina, sulfato de heparano, sulfato de dermatano, sulfato de heparina, sulfato de dextrano, fucoidano y carragenina, por ejemplo. Estas cadenas principales pueden modificarse para contener cadenas protectoras hidrófilas para obtener el componente de vehículo de la presente invención a partir del que puede unirse iónicamente la molécula de carga básica para completar una composición de la presente invención. Como una realización adicional de la composición donde la cadena principal ya contiene grupos sulfato, sulfonato o fosfato, la cadena principal puede modificarse adicionalmente para contener grupos sulfato, sulfonato o fosfato adicionales para aumentar la densidad de carga aniónica de la composición de la presente invención para potenciar adicionalmente su capacidad para unirse con molécula de carga básica (las que tienen el punto isoeléctrico por encima de 7).

Las cadenas principales poliméricas pueden incluir polisacáridos. Los polisacáridos abarcan disacáridos, oligosacáridos y polímeros mayores de hasta millones de Daltons. Las cadenas principales poliméricas incluyen polisacáridos, oligosacáridos y productos derivados químicamente de los mismos, que portan grupos carboxílicos modificables, grupos alcohólicos o grupos amino, que pueden ilustrarse por: polixilitol, ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido manurónico, ácido hialurónico, ácido péctico, ácido neuramínico, ácido algínico, carragenina; dextranos oxidados; dextrano aminado, por ejemplo que contiene grupos amino unidos. Las cadenas principales poliméricas incluyendo polisacáridos pueden ser lineales o ramificadas, pueden estar carboxiladas, carboximetiladas, sulfatadas o fosforiladas. Las cadenas principales poliméricas que incluyen polisacáridos pueden hacerse reaccionar con derivados de ácidos carbónico, dicarbónico, sulfúrico, aminosulfúrico, fosfórico con unión resultante de grupos carboxílico, aminocarboxílico, carboximetilo, sulfúrico, amino o fosfato. Las cadenas principales poliméricas que incluyen polisacáridos pueden obtenerse mediante la alteración química de dextrano, manano, xilano, pululano, celulosa, quitosano, agarosa, fucoidano, galactano, arabinano, fructano, fucano, quitina, pustulano, levano o pectina. Además estos polisacáridos pueden estar representados por heteropolímeros u homopolímeros de monosacáridos tales como, pero sin limitación, glucosa, galactosa, manosa, galactosa, desoxiglucosa, ribosa, desoxirribosa, arabinosa, fucosa, xilosa, xilulosa y ribulosa.

Las cadenas principales poliméricas también incluyen polímeros (lineales o ramificados) tales como polietilenimina, poliamidoamina, polialiamina, ácido poliacrílico; polialcoholes (por ejemplo, alcohol polivinílico) con los que se unen químicamente grupos carboxílico, amino o alcohólico y/o que están disponibles para la unión de más grupos aniónicos. Estas cadenas principales poliméricas pueden ser cadenas no biológicas para las que están disponibles grupos carboxílico, amino o alcohólico para unión de más grupos aniónicos. La cadena principal polimérica puede contener grupos aniónicos y puede realizarse modificación adicional para aumentar el número de grupos aniónicos o para potenciar la calidad de los grupos aniónicos tal como convertir grupos carboxilo en grupos sulfato, sulfonato o fosfato.

El polímero que actúa como la cadena principal polimérica puede ser poli(etilenglicol) (PEG) con grupos funcionales en el extremo terminal o cerca del extremo terminal que compone el agrupamiento (2 o más) de grupos aniónicos con los que puede unirse la proteína básica. Esquemáticamente, esta realización puede estar representada por lo siguiente: PEG-grupos aniónicos\*proteína básica, donde el asterisco representa interacción iónica que es una relación muy específica entre elementos de la presente invención. Como alternativa, el PEG puede funcionalizarse a lo largo de su cadena principal permitiendo que el agrupamiento aniónico sea colgante de la cadena principal de la que puede asociarse proteína básica mediante interacción electrostática directa. Esta estructura también puede permitir además cadenas protectoras colgantes.

De acuerdo con la invención, la cadena principal polimérica comprende polilisina, poliornitina, poliarginina, poliglutamato, poliaspartato, policisteína, poliserina, politreonina, politirosina, heparina, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de heparano, sulfato de queratano, carragenina, pectina, fucoidano o dextrano.

#### 5 **b) Restos aniónicos o grupos aniónicos**

Los ejemplos de grupos aniónicos que pueden unirse químicamente con la cadena principal incluyen: -fosfato; -sulfato; -sulfonato; y -carboxilo. La unión entre los grupos amino en la proteína y los grupos carboxilo no es tan fuerte como con grupos aniónicos tales como fosfato, sulfato y sulfonato. Esto se debe a que el grupo carboxilo tiene pKa de aproximadamente 6, mientras que el sulfato, sulfonato y fosfato tienen pKa de menos de 3. Esto hace que la población de sulfato, sulfonato y fosfato tenga carga principalmente negativa a pH por encima de 3. La población de grupo carboxilo tendrá principalmente carga negativa a pH 6 y superior lo que le proporciona cierta limitación para formar anión en condiciones levemente ácidas. Además, la mayoría de los restos que contienen policarboxilo tienen capacidad de quelación que puede alterar la función fisiológica que requiere metales de molécula de carga o proteínas sanguíneas. Los grupos aniónicos preferidos son fosfato, sulfato y sulfonato. Sin embargo, esto no excluye grupos carboxilo de diversas realizaciones de la presente invención. Los grupos aniónicos en la presente composición pueden localizarse en un agrupamiento. El agrupamiento aniónico se define para el fin de la presente memoria descriptiva como dos o más grupos aniónicos unidos a la cadena principal por un enlace covalente común y que cada carga aniónica no está a más de 12 átomos de la otra carga aniónica. Se obtienen grupos aniónicos de carboxilato, sulfato, sulfonato y/o fosfato. Es preferible que los átomos de azufre o fósforo que componen las cargas aniónicas estén separados entre sí por más de tres átomos para evitar que sean un fuerte quelante de metales. Una vez que el metal está quelado, el metal añadirá carga positiva al sitio o agrupamiento aniónico haciéndolo menos capaz de unirse con moléculas de carga catiónicas o con carga positiva con punto isoelectrónico mayor de 7. En una realización, se excluye el metal, ya que puede crear potencialmente una fuerte interacción de coordinación que no permitiría la liberación calibrada de la molécula de carga. La mayor separación entre el átomo de azufre y/o fósforo en un grupo aniónico puede ayudar a reducir o debilitar las propiedades quelantes del agrupamiento aniónico del vehículo. De esta manera la liberación de las moléculas de carga puede facilitarse con sal fisiológica. Asimismo, la quelación también puede inactivar moléculas de carga que contienen metales o calcio tales como Factor VIII, además de neutralizar la propiedad aniónica del vehículo. Esto es especialmente cierto con fosfato en forma de bisfosfonato en el que el átomo de fósforo está separado por solamente un átomo o las cargas están separadas por 3 átomos. Debido a esto, el bisfosfonato es un fuerte quelante de metal que puede inactivar moléculas biológicas que contienen metales de transición o metales alcalinotérreos tales como calcio. Los átomos de azufre y fósforo que forman grupos aniónicos en la composición de la presente invención están separados en más de un átomo lo que los hace quelantes débiles. Esto se consigue mediante el uso de espaciador de policarboxilo amina, que después contienen varios grupos aniónicos fuertes que contienen átomos de azufre y/o fósforo. En una realización de la invención, la relación organizativa de la molécula de carga catiónica con el grupo aniónico es mediante interacción iónica directa y no está mediada por ningún otro ion metálico divalente. Dicha relación organizativa distingue la presente invención de otras composiciones poliméricas que usan enlaces metálicos para moléculas de carga unidas. Además, la presente invención no se basa en interacciones hidrófobas para unir moléculas de carga ya que las moléculas de carga que tienen carga positiva o tienen un punto isoelectrónico por encima de 7,3 son hidrosolubles y es poco probable que sean hidrófobas. Dichas moléculas de carga con carga alta de la presente invención repelen grupos hidrófobos como se conoce en la técnica. Las moléculas de carga de la presente invención están limitadas a las moléculas de carga que no interaccionan con grupos hidrófobos de forma significativa (las que tienen Kd para grupos hidrófobos de más de 50  $\mu$ M). Un agrupamiento de grupos carboxilo separados por 4 o más átomos también será un quelante menos fuerte o incluso no quelante y puede usarse como el agrupamiento aniónico de la presente invención. Para el fin de la presente memoria descriptiva, el grupo aniónico o un agrupamiento de grupos aniónicos colgantes de la cadena principal mediante un único enlace químico no tiene más de 1.500 Da de masa molecular excluyendo la masa de cadena principal. Esto es para facilitar la protección por cadenas protectoras en las que la masa preferida es entre 2.000 Da y 20.000 Da.

#### 50 **c) Cadenas protectoras**

Los ejemplos de cadenas protectoras (denominadas indistintamente cadenas laterales protectoras o cadenas protectoras hidrófilas) incluyen poli(etilenglicol), que puede esterificarse mediante ácido dicarboxílico para formar un monoéster de poli(etilenglicol); monoéster de metoxi poli(etilenglicol) (MPEG) o un copolímero de poli(etilenglicol) y monoéster de poli(propilenglicol) en forma de un éster con un ácido dicarboxílico que proporciona el extremo de estos copolímeros un grupo carboxilo que puede usarse para unirlos covalentemente con una cadena principal (véase anteriormente). Otras formas incluyen poli(etilenglicol)-carboxilo; metoxi poli(etilenglicol)-carboxilo; poli(etilenglicol)-carboximetilo; metoxi poli(etilenglicol)-carboximetilo; poli(etilenglicol)-monoamina; metoxi poli(etilenglicol) monoamina; poli(etilenglicol) hidrazida; metoxi poli(etilenglicol) hidrazida; metoxi poli(etilenglicol) imidazolidina copolímero en bloque de poli(etilenglicol) y uno o varios polímeros representados por poliaminoácido, polisacárido, poliamidoamina, polietilenimina donde estos bloques se alternan para proporcionar un copolímero en bloque lineal. En una realización, el peso molecular global de una cadena protectora puede ser mayor de 300 Daltons pero que no supera 10.000 Daltons.

65 De acuerdo con la invención, múltiples cadenas protectoras, en donde cada cadena protectora comprende poli(etilenglicol), están unidas covalentemente con la cadena principal polimérica mediante un único enlace.



En un ejemplo proporcionado en el presente documento, una composición de la presente invención comprende una cadena principal polimérica lineal con un grado de polimerización en el intervalo de 2-10.000 con la que están unidas de forma independiente y covalentemente cadenas protectoras de metoxipolietilenglicol (mPEG) con un masa de 300-25.000 Daltons y grupos aniónicos (que pueden ser de sulfato, sulfonato o fosfato pero no excluyen grupos carboxilo como los grupos aniónicos) donde dichas cadenas protectoras y grupos aniónicos están unidos de forma independiente o colgantes de la cadena principal. En otro ejemplo, el grado de polimerización de la cadena principal polimérica está en el intervalo de 25-1.000. En otro ejemplo más, el grado de polimerización de cadena principal polimérica está en el intervalo de 50 a 300.

#### d) Agentes activos: Proteínas y péptidos básicos

1) *Proteínas*: Las proteínas y péptidos básicos se reconocen en la técnica como proteínas y péptidos con punto isoelectrico mayor de 7. Las proteínas básicas incluyen metaloexopeptidasas tales como lisostafina que es un agente antiinfeccioso. Los vehículos de la presente invención pueden unirse esencialmente con la mayoría de proteínas básicas o los agentes activos de proteínas básicas y derivados, fragmentos y análogos de los mismos siempre que permanezcan básicos o su punto isoelectrico permanezca por encima de 7. Las proteínas básicas y sus derivados, fragmentos y análogos pueden producirse mediante técnicas recombinantes a partir de construcciones de ADN. Las proteínas con punto isoelectrico por debajo 7 pueden prepararse para tener un punto isoelectrico mayor de 7, añadiendo aminoácidos básicos en la secuencia mediante el uso de técnicas recombinantes de ADN o durante la síntesis. Los aminoácidos básicos son lisina y arginina. Los péptidos pueden hacerse básicos durante la síntesis añadiendo un aminoácido básico en su extremo manteniendo al mismo tiempo la bioactividad de la secuencia principal. Como alternativa, la secuencia básica puede añadirse de modo que una vez se ha liberado en la sangre o ha entrado en la célula, la secuencia básica puede escindirse mediante una proteasa endógena (presente de forma natural en el cuerpo de un organismo) que libera los péptidos activos. Los agentes activos de proteína básica de la presente invención pueden ser o no productos recombinantes. Los agentes activos de proteína básica de la presente invención pueden ser producto de la producción recombinante en células de mamífero que pueden estar implicados o no en la modificación de secuencia de ADN que evita la glucosilación. Los agentes activos de proteína básica de la presente invención pueden ser de versión nativa purificada del organismo que produce de forma natural la proteína básica. Los agentes activos de proteína básica de la presente invención pueden purificarse de un organismo. Por ejemplo, puede purificarse lisostafina, una proteína básica ilustrativa, del organismo que la produce de forma natural, tal como *Staphylococcus simulans* o *Staphylococcus staphylolyticus*. Los vehículos de la presente invención pueden unirse con proteínas básicas así como análogos, derivados y fragmentos de los mismos.

Los vehículos de la presente invención pueden unirse con proteínas básicas y análogos, derivados y fragmentos de los mismos. En realizaciones específicas los vehículos de la presente invención se unen con lisostafina. La lisostafina está reconocida en la técnica y es bacteriolítica para *Staphylococcus aureus*. Esto incluye derivados y fragmentos de lisostafina que tienen sustancialmente el mismo efecto biológico que la lisostafina de origen natural. La lisostafina puede aislarse o prepararse de forma sintética. También pueden aislarse o prepararse de forma sintética derivados y fragmentos. Es posible que determinados derivados de lisostafina puedan tener un punto isoelectrico diferente o incluso tener punto isoelectrico por debajo de 7, pero siempre que haya un agrupamiento de cargas positivas en una proteína lejos de las cargas negativas, la proteína puede unirse potencialmente con el grupo aniónico del vehículo de la presente invención. Para determinar si la interacción de lisostafina con el vehículo es interacción aniónica-catiónica directa y no mediante ion metálico multivalente intermediario se añade NaCl 0,4 M. La interacción aniónica-catiónica puede alterarse mediante NaCl 0,4 M mientras que la interacción mediada por ion metálico multivalente a través de enlace coordinado no puede alterarse mediante NaCl 0,4 M (véase ejemplo posterior). En una realización, puede generarse un derivado de lisostafina mediante truncamiento de la secuencia de aminoácidos o la adición de otros aminoácidos o grupos funcionales tales como grupo amino básicos. En una realización, la lisostafina (incluyendo sus análogos, derivados y fragmentos) comprende un aminoácido básico total (lisina y arginina) mayor que los aminoácidos ácidos totales (glutamato y aspartato), proporcionando de este modo a la proteína una carga neta positiva capaz de unirse con el vehículo de núcleo aniónico de la presente invención. Ocasionalmente, una proteína o un péptido con punto isoelectrico por debajo de 7 pueden tener todos los aminoácidos básicos en un extremo de la molécula y todos los aminoácidos ácidos en el otro extremo de la molécula o como alternativa la proteína o el péptido puede plegarse de tal manera que el aminoácido ácido esté internado y los aminoácidos básicos estén expuestos. En estas circunstancias aún puede unirse con el vehículo aniónico de la presente invención siempre que los aminoácidos básicos estén en una región espacialmente separada de la molécula. La determinación de si una proteína o un péptido con punto isoelectrico inferior a 7 interaccionará con el vehículo de la presente composición tendrá que determinarse caso a caso usando el método descrito en el presente documento y que puede ser realizado fácilmente por un experto en la materia sin experimentación indebida. La lisostafina tiene de forma natural un punto isoelectrico entre pH 9-10, lo que permite unirla estrechamente con el vehículo de la presente invención. La lisostafina, por lo tanto, proporciona grupos amino con carga positiva de modo que no haya necesidad de modificarla sintéticamente para contener aminoácidos básicos. La lisostafina puede cargarse en el vehículo de la presente invención mezclando una solución de vehículo con una solución de lisostafina a temperatura entre 15 a 37 grados Celsius. El vehículo cargado puede liofilizarse y reconstituirse antes de su uso. La lisostafina de la presente invención o proteínas básicas en general pueden modificarse adicionalmente para contener más aminoácidos básicos para potenciar la unión con los vehículos

de la presente invención.

La lisostafina, uno de los agentes activos de la presente invención es una enzima peptidasa producida por determinadas cepas de microorganismos *Staphylococcus* con actividad antibacteriana contra estafilocos. La lisostafina es una peptidasa de 25 kDa producida por *Staphylococcus simulans* que escinde un enlace glicina-glicina único de un cruce entre péptidos de la pared celular de *Staphylococcus aureus* con la designación de número de EC de EC 3.4.24.75. La lisostafina es una proteína básica ilustrativa, más específicamente una proteína básica glicilo-glicilo.

2) *Péptidos*: Entre los péptidos de acción intracelular hay péptidos que pueden modificar las rutas de transducción de señal. Para que los péptidos modifiquen las rutas de transducción de señales, puede ser necesario que penetren en las membranas celulares. La capacidad de los péptidos para penetrar en la membrana celular depende del número de aminoácidos básicos en proximidad estrecha entre sí. Estos aminoácidos básicos en proximidad estrecha entre sí se denominan dominio de transducción de péptidos o péptidos penetrantes celulares (Cell-Penetrating Peptides por Ulo Langel, Pharmacology & Toxicology Series, 2002, CRC Press, Nueva York). Todos estos péptidos y sus derivados son moléculas de carga ideales para el vehículo de núcleo aniónico de la presente invención. En general todos los péptidos (polipéptidos con 50 o menos aminoácidos) que contienen dominio de transducción de péptidos o secuencia penetrante celular pueden suministrarse usando el vehículo de la presente invención. La secuencia de dominio de transducción de péptidos o péptido penetrante celular se caracteriza por la presencia de una secuencia de 5-10 aminoácidos con al menos 2 aminoácidos básicos (lisina y/o arginina) más que el número de aminoácidos ácidos (glutamato y aspartato). Algunos ejemplos de estos se enumeran todos en un libro titulado Cell-Penetrating Peptides por Ulo Langel, Pharmacology & Toxicology Series, 2002, CRC Press, Nueva York, que se incorpora por la presente por referencia. Debería observarse que en todos los casos el péptido penetrante celular sigue la misma normal general de que contiene 5-10 aminoácidos con al menos 2 aminoácidos básicos (lisina y/o arginina) más que el número de aminoácidos ácidos (glutamato y aspartato). Desafortunadamente todos estos péptidos son degradados y eliminados por el riñón muy rápido una vez que están en la circulación, lo que requiere la administración de una gran cantidad de este péptido (10 mg/kg en ratones). Estos péptidos se beneficiarán significativamente del vehículo de la presente invención. Debido a que todos estos péptidos de acción intracelular con secuencia penetrante celular catiónica tendrán secuencias básicas, serán todos moléculas de carga ideales para la composición de núcleo aniónico de la presente invención. El vehículo aumentará la semivida en circulación en sangre de estos péptidos y acumulará o dirigirá el péptido al sitio de inflamación que está presente en enfermedades tales como artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino crónica, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, aterosclerosis y diabetes entre otras.

#### a) *Péptidos y proteínas antiinflamatorios.*

En una realización, los péptidos/proteínas de la presente invención que son útiles en el tratamiento de la inflamación pueden ser un péptido que bloquea la acción de NFκB y contiene una secuencia penetrante celular. Son ejemplos de enfermedades inflamatorias crónicas que pueden beneficiarse de la composición de la presente invención: artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino crónica, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y diabetes. La secuencia de péptido penetrante celular es un péptido que contiene una serie de aminoácidos básicos (tales como lisina o arginina) que permite la penetración en la célula. Esta secuencia puede unirse a una secuencia que puede suprimir la activación de NFκB y por tanto prevenir la inflamación. Ejemplos: (SEQ ID NO: 60) Péptido básico-Thr-Ala-Lue-Asp-Trp-Ser-Trp-Lue-Gln-Thr-Glu-OH o (SEQ ID NO: 61) Péptido básico-Thr-Thr-Lue-Asp-Trp-Ser-Trp-Lue-Gln-Met-Glu-OH. Un ejemplo específico de este tipo de péptido tiene la secuencia de (SEQ ID NO: 1) (Lys)<sub>8</sub>-Gly-Gly-Thr-Ala-Lue-Asp-Trp-Ser-Trp-Lue-Gln-Thr-Glu (o KKKKKKKK-GG-TALDWSWLQTE: de Dave S., *et al.*, 2007, Journal of Immunology, vol 179, p7852-7859). Una alternativa a esta secuencia es (SEQ ID NO: 2) H-Asp-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Thr-Ala-Leu-Asp-Trp-Ser-Trp-Leu-Gln-Thr-Glu-OH (o DRQIKIWFQNRMRKWKK-TALDWSWLQTE: de Shibata, W., *et al.* 2007. Journal of Immunology, vol 179, p2681-2685; Jimi, E., *et al.* 2004. Nat. Med., 10, 617; Siegmund, D., *et al.* 2001. J. Biol. Chem. 276, 43708. May, M.J., *et al.* 2000; Science 289, 1550; Li, Q., *et al.* 1999; y Science 284, 1999). Como alternativa una secuencia (SEQ ID NO: 3) (Arg)<sub>8</sub>-Gly-Gly-Thr-Ala-Lue-Asp-Trp-Ser-Trp-Lue-Gln-Thr-Glu-OH (o RRRRRRRR-GG-TALDWSWLQTE) también será una molécula de carga ideal de la presente invención. Un análogo de la secuencia inhibidora de la SEQ ID NO: 1 y n.º 2 también es una molécula de carga ideal para la composición de la presente invención. Esta tiene la secuencia de (TAT-NBD; SEQ ID NO: 4) H-Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Gly-Thr-Thr-Lue-Asp-Trp-Ser-Trp-Lue-Gln-Met-Glu-OH (o YGRKKRRQRRRG-TTLDWSWLQME: de Dai, S., *et al.*, 2004. J. Biol. Chem. 279(36): 37219). Otro ejemplo es el péptido que puede actuar en el nivel intracelular para detener enfermedades inflamatorias autoinmunitarias uniéndose con la proteína de interacción con JNK que activa JNK. Un ejemplo es el péptido básico unido a (SEQ ID NO: 62) Arg-Pro-Thr-Thr-Lue-Asn-Lue-Phe-OH (Péptido básico-Arg-Pro-Thr-Thr-Lue-Asn-Lue-Phe-OH). Un ejemplo más específico de este tiene la secuencia (SEQ ID NO: 5) Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Pro-Lys-Arg-Pro-Thr-Thr-Lue-Asn-Lue-Phe (o YGRKKRRQRRRRPKRPTTLNLF de Melino, M., *et al.*, 2008, Journal of Immunology, vol 181, p7300-7306). La parte de la SEQ ID NO: 5 Arg-Pro-Thr-Thr-Lue-Asn-Lue-Phe es de la región de unión a JNK y la secuencia Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Pro-Lys- es el péptido penetrante celular o el dominio de transducción de péptidos. Otra secuencia que cumplirá el mismo fin que la SEQ ID NO: 4 es SEQ ID NO: 6 (Arg)<sub>8</sub>-Arg-Pro-Thr-Thr-Lue-Asn-Lue-Phe-OH. Otro péptido que puede suprimir la inflamación cuando se une a un péptido básico es el P65-P1. Este es el péptido básico unido a (SEQ ID NO: 63) Gln-Leu-Arg-Arg-Pro-Ser-Asp-Arg-Glu-Leu-Ser-Glu-OH. Cuando se une a un péptido básico procedente de antenapedia (PTD o dominio de translocación de péptidos), esto puede suprimir la activación de NF-κB inducida por lipopolisacárido,

interleucina-1, ácido ocaidaico, forbol 12-miristato 13-acetato y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este péptido puede desempeñar un papel en la sensibilización de células a la apoptosis inducida por TNF, doxorubicina y cisplatino. p65-P1 contiene un único sitio de fosforilación y este es necesario para el nivel de actividad de NF-κB. Más específicamente la secuencia es (SEQ ID NO: 7) H-Asp-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Gln-Leu-Arg-Arg-Pro-Ser-Asp-Arg-Glu-Leu-Ser-Glu-OH (o DRQIKIWFQNRMRKWKK-QLRRPSDRELSE de Takada, Y. *et al.*, 2004, J. Biol. Chem. 279, p15096). Como alternativa la secuencia puede ser (SEQ ID NO: 8) (Arg)<sub>8</sub>-Gln-Leu-Arg-Arg-Pro-Ser-Asp-Arg-Glu-Leu-Ser-Glu-OH. Otras secuencias que interfieren con la activación de NF-κB incluyen péptidos básicos unidos a secuencias seleccionadas de (SEQ ID NO: 64) -Gln-Arg-Lys-Arg-Gln-Lys-Leu-Met-Pro-OH (o QRKRQKLMP de Lin, Y.-Z., *et al.* 1995. J. Biol. Chem. 270, 14255) o (SEQ ID NO: 65) -Asp-Asp-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Lue-Asp-Ser-Met-Lys-Asp-Glu-amida (o DDRHDSGLDSMKDE-NH<sub>2</sub> de Swaroop, N., *et al.* 2001, Pharm. Res. 18, 1631; Traenckner, E.B., *et al.* 1995, EMBO. J. 14, 2876). Son ejemplos más específicos (SEQ ID NO: 9) (Arg)<sub>8</sub>-Gln-Arg-Lys-Arg-Gln-Lys-Leu-Met-Pro-OH y (SEQ ID NO: 10) (Arg)<sub>8</sub>-DDRHDSGLDSMKDE-NH<sub>2</sub>. *Cortistatina-29 (humano)*: (SEQ ID NO:11) Pyr-Glu-Gly-Ala-Pro-Pro-Gln-Gln-Ser-Ala-Arg-Arg-Asp-Arg-Met-Pro-Cys-Arg-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Ser-Ser-Cys-Lys-OH (Enlace disulfuro). Pyr es ácido piroglutámico. Esto representa un factor antiinflamatorio, inmunomodulador con un uso terapéutico multietapa potencial en el tratamiento del choque séptico y la enfermedad de Crohn. (E. González-Rey *et al.*, J. Exp. Med., 203, 563 (2006); E. González-Rey *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 4228 (2006)). Estos péptidos o sus derivados son ejemplos de moléculas de carga para el vehículo de la presente invención.

*Interferones de Tipo I, Tipo II y Tipo III.* Los interferones tienen actividad antiinflamatoria, especialmente interferones de tipo I. El interferón beta (pI = 8,9-9,7) por ejemplo es un interferón de tipo I usado para el tratamiento de la esclerosis múltiple y tiene actividad antiinflamatoria. El punto isoeléctrico básico de alguno de estos interferones y/o la presencia de una parcela de carga positiva en su superficie es ideal para el vehículo de la presente invención. Dicha propiedad permite que se unan con los vehículos de la presente invención. Aunque los expertos y conocedores de la materia esperarán que dicha unión ilustrada por HB-EGF se vea superada por componentes sanguíneos, el descubrimiento sorprendente de los inventores es que dicha forma de unión con el vehículo puede soportar la presencia de componentes sanguíneos, un resultado que es inesperado.

#### b) Péptidos antiinfecciosos (para tratamiento de infecciones)

Las *magaininas* son antibióticos peptídicos con actividades antibacterianas y antiparasitarias, extraídos originalmente de la piel de *Xenopus laevis*. Magainina 1 y 2 son péptidos estrechamente relacionados de 23 aminoácidos cada uno y difieren en dos sustituciones. Estos péptidos antimicrobianos tienen actividad de amplio espectro, inespecífica contra una amplia serie de microorganismos, incluyendo virus, bacterias grampositivas y gramnegativas, protozoos, levaduras y hongos, y también pueden ser hemolíticos y citotóxicos para células cancerosas. La magainina 1 es una bactericida. Tanto magainina 1 como 2 muestran acción inhibitoria hacia el virus del Herpes simple de tipo 1 (VHS-1) y VHS-2. (Williams, RW. *et al.* Biophysical J. 53, 631A (1988); Morvan, A. *et al.* Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 3, 327 (1994); Matanic, A. *et al.* Int. J. Antimicrob Agents 23, 382 (2004); Zasloff, M. Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 5449 (1987)) Secuencia de Magainina 1 (SEQ ID NO: 12) H-Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Gly-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Lys-Ser-OH. Este péptido o su derivado es un ejemplo de una molécula de carga para el vehículo de la presente invención.

La Magainina 2 asume una hélice anfifílica cuando se une con fosfolípidos ácidos, formando un poro compuesto de un complejo supramolecular de péptido-lípido, dinámico. (SEQ ID NO: 13) H-Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Asn-Ser-OH (Zasloff, M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 5449 (1987); Cruciani, RA. *et al.* EJEMPLO 8, 187 (1992); Corzo, G. *et al.* Biochem. J. 359, 35 (2001); Matsuzaki, K. *et al.* Biochem. 36, 2104 (1997)). Este péptido o su derivado es un ejemplo de una molécula de carga para el vehículo de la presente invención.

La *Cecropina A* (SEQ ID NO: 14; H-Lys-Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Val-Gly-Gln-Asn-Ile-Arg-Asp-Gly-Ile-Ile-Lys-Ala-Gly-Pro-Ala-Val-Ala-Val-Val-Gly-Gln-Ala-Thr-Gln-Ile-Ala-Lys-NH<sub>2</sub>) es un péptido antimicrobiano de 37 restos lineal, catiónico, de origen natural. La *Cecropina A* destruye bacterias disipando gradientes iónicos electroquímicos transmembrana (Silvestro, L. *et al.* Biophysical J. 72, A195 (1997); Andreu, D. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6475 (1983); Silvestro, L. *et al.* Biochem. 36, 11452 (1997)). Este péptido o su derivado es un ejemplo de una molécula de carga para el vehículo de la presente invención.

La *Cecropina B* (SEQ ID NO: 15; Lys-Trp-Lys-Val-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Met-Gly-Arg-Asn-Ile-Arg-Asn-Gly-Ile-Val-Lys-Ala-Gly-Pro-Ala-Ile-Ala-Val-Leu-Gly-Glu-Ala-Lys-Ala-Lue-NH<sub>2</sub>) es un péptido antibacteriano pequeño de la polilla de cecropia, *Hyalophora cecropia*. Los péptidos antimicrobianos son esenciales para la defensa innata del hospedador como efectores de la eliminación de patógenos y pueden afectar a la célula hospedadora para promover la reparación de heridas. Kulagina, NV. *et al.* Sens Actuators B Chem. 121, 150 (2007); Vaara, M. *et al.* Antimicrob. Agents Chemo. 38, 2498 (1994); Florack, D. *et al.* Transgenic Res. 4, 132 (1995); Lee, P. *et al.* Wound Repair Regen. 12, 351 (2004)). Este péptido o su derivado es un ejemplo de una molécula de carga para el vehículo de la presente invención.

*Péptido derivado del factor plaquetario humano 4 o C18G* (SEQ ID NO: 16; H-Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly-OH) del factor plaquetario humano 4 es activo contra *Salmonella*. C18G es un

péptido  $\alpha$ -helicoidal sintético procedente del factor plaquetario humano IV. Se descubrió que este péptido es antibacteriano y activo contra *Salmonella*. (Coconnier-Polter, M-H. *et al.* Appl. Environ. Microbiol. 71, 6115 (2005); Darveau, R. *et al.* J. Clin. Invest. 90, 447 (1992)). Este péptido o su derivado es un ejemplo de una molécula de carga para el vehículo de la presente invención.

La *Histatina-8 [Péptido Inhibidor de Hemaglutinación (HIP)]* (SEQ ID NO: 17; H-Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr-OH) es una de las histatinas salivares humanas (Hsts), que pertenece a la familia de los polipéptidos salivares, son proteínas pequeñas, catiónicas y ricas en histidina. Tienen actividades bactericidas y antifúngicas potentes contra *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* y son por lo tanto reactivos terapéuticos potenciales contra especies de *Candida*. Destruyen células fúngicas uniéndose con la membrana celular, internalizando y alterando mecanismos reguladores del volumen y la función mitocondrial, lo que conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno y pérdida no lítica. (Yoshida, M. *et al.* Biol. Pharm. Bull. 24, 1267 (2001); Ahmad, M. *et al.* J. Histochem. Cytochem. 52, 361 (2004)). Este péptido o su derivado es un ejemplo de una molécula de carga para el vehículo de la presente invención.

La *Histatina-5* (SEQ ID NO: 18; H-Asp-Ser-His-Ala-Lys-Arg-His-His-Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr - OH) es un péptido antimicrobiano salivar básico humano con fuertes propiedades fungicidas (Helmerhorst, E. *et al.* J. Biol. Chem. 274, 7286 (1999)). Este péptido o su derivado es un ejemplo de una molécula de carga para el vehículo de la presente invención.

La *Histatina-3 o H3* (SEQ ID NO: 19; H-Asp-Ser-His-Ala-Lys-Arg-His-His-Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr-Arg-Ser-Asn-Tyr-Leu-Tyr-Asp-Asn - OH) se encuentra en la saliva humana y posee propiedades antimicrobianas potentes. Este péptido rico en histidina es un inhibidor de las propeptidasa convertasas furina y PC7, pero actúa como sustrato para PC1. (Basak, A. J. Pept. Res. 49, 596(1997); Koshlukova, S. *et al.* Infect Immun. 68, 6848 (2000)). Este péptido o su derivado es un ejemplo de una molécula de carga para el vehículo de la presente invención.

El *HNP-1 o Péptido de Neutrófilos Humanos Defensina-1* (SEQ ID NO: 21; H-Ala-Cys-Tyr-Cys-Arg-Ile-Pro-Ala-Cys-Ile-Ala-Gly-Glu-Arg-Arg-Tyr-Gly-Thr-Cys-Ile-Tyr-Gln-Gly-Arg-Leu-Trp-Ala-Phe-Cys-Cys-OH (Enlace disulfuro: 2-30, 4-19, 9-29)). Las defensinas de mamífero son abundantes en los gránulos azurófilos citoplasmáticos de neutrófilos, células de Paneth del intestino delgado y algunos macrófagos. El HNP-1 es un péptido que posee amplias actividades tanto antimicrobianas (para bacterias tanto Grampositivas como Gramnegativas) como citotóxicas. HNP-1 reduce la infección adenovírica en más del 95 %. (Frick, I. *et al.* J. Biol. Chem. 278, 16561 (2003); Valore, E. *et al.* J. Clin. Invest. 97, 1624 (1996); Mizukawa, N. *et al.* Anticancer Res. 20, 1125 (2000); Bastian, A. y H. Schafer, Regul Pept. 101, 157 (2001)). Este péptido o su derivado es un ejemplo de una molécula de carga para el vehículo de la presente invención.

La *Apidaecina IA* (SEQ ID NO: 22; H-Gly-Asn-Asn-Arg-Pro-Val-Tyr-Ile-Pro-Gln-Pro-Arg-Pro-Pro-His-Pro-Arg-Ile - OH) es un derivado de péptido antibacteriano particular hallado en la linfa de abejas melíferas inmunes. Las Apidaecinas, los componentes más prominentes de la defensa humoral de la abeja melífera contra la invasión microbiana, son una serie de péptidos de 18 a 20 restos, ricos en prolina, pequeños. Inhiben la viabilidad de bacterias Gramnegativas; con actividad letal casi inmediata, independiente de un mecanismo "lítico" convencional, e implican reconocimiento estereoselectivo de moléculas diana. (Casteels-Josson, K. *et al.* EMBO J. 12, 1569 (1993); Casteels, P. J. Biol. Chem. 269, 26107 (1994); Li, W. *et al.* Pept. 27, 2350 (2006)). Este péptido o su derivado es un ejemplo de una molécula de carga para el vehículo de la presente invención.

*Pirrocorticina*: (SEQ ID NO: 23; H-Val-Asp-Lys-Gly-Ser-Tyr-Leu-Pro-Arg-Pro-Thr-Pro-Pro-Arg-Pro-Ile-Tyr-Asn-Arg-Asn-OH). Este péptido antibacteriano catiónico rico en prolina pirrocorticina destruye bacterias sensibles mediante la unión con la proteína de choque térmico de 70 kDa DnaK e inhibiendo el plegamiento proteico (Cudic, M. *et al.* Peptides 23, 2071 (2002), Bulet, P. *et al.* Dev. Comp. Immunol 23, 329 (1999)). Este péptido o su derivado es un ejemplo de una molécula de carga para el vehículo de la presente invención.

*Péptido citolítico 1 (KP1)*: (SEQ ID NO: 24 (KLAKLAK)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) es un péptido antimicrobiano helicoidal que rompe la membrana celular altamente aniónica (la membrana bacteriana es más aniónica que la membrana celular de mamífero) y destruye células bacterianas preferentemente. Una secuencia más larga (SEQ ID NO: 25 (KLAKLAK)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>) es más selectiva contra células bacterianas (Javadpour, M.M. *et al.* J. Med. Chem. 1996, 39: 3107-3113). Estos péptidos o sus derivados serán moléculas de carga ideales para el vehículo de la presente invención.

*Fragmento de Catelicidina Humana 104-140 (LL-37)*: (SEQ ID NO: 26: LLGDFFRKSK EKIGKEFKRI VQRIKDFLRNLVPRTES). La proteína antimicrobiana catiónica humana de 18 kDa (hCAP-18) pertenece a la clase de catelicidinas. Se libera de granulocitos de neutrófilos activados. Después de la liberación, el extremo C terminal  $\alpha$ -helicoidal de 37 aminoácidos se escinde, formando el péptido antimicrobiano funcional LL-37. Aparte de ser antimicrobiano, LL-37 también se une con LPS, y se ha mostrado previamente que esta unión reduce la liberación de óxido nítrico inducida por LPS de la aorta de la rata y protege a los ratones de mortalidad por LPS. También se ha descubierto que LL-37 tiene actividades inmunomoduladoras y quimiotácticas mediadas a través del receptor de péptido de formilo FPRL1. Debido a que el péptido derivado de catelicidina humana LL-37 se une con y neutraliza lipopolisacáridos (LPS) bacterianos, esto podría tener por lo tanto efectos beneficiosos en el tratamiento de choque

séptico. Otras variantes que incluyen truncamiento N terminal de LL-37, denominado 106 (aa 106 a 140, SEQ ID NO: 27: GDFFRKSKEK-IGKEFKRIVQ-RIKDFLRNLVPRTES), 110 (aa 110 a 140, SEQ ID NO: 28: RKSKEKIGKEFKRIVQRIKD FLRNLVPRTE S), BMAP-27 (SEQ ID NO: 30: GRFKRFRKFKKFKLFFKLLSPVIPLLHL-am) y una variante más hidrófoba, la LLKKK de 18 unidades (SEQ ID NO: 29: KLFKRIVKRI-LKFLRKL). LL-37, fragmentos 106 y 110 y el LLKKK de 18 unidades inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, y *Candida albicans* en un ensayo de difusión radial, inhibieron la producción de óxido nítrico vascular inducida por lipopolisacáridos y atrajeron granulocitos de neutrófilos de forma similar. Aunque los fragmentos 106 y 110 provocaron menos hemólisis y fragmentación de ADN en células cultivadas que LL-37, el LLKK de 18 unidades indujo hemólisis grave. El efecto antibacteriano de los fragmentos 106 y 110 no se vio afectado por el suero, mientras que el efecto de LL-37 se redujo. La retirada de aminoácidos hidrófobos N terminales de LL-37 reduce su citotoxicidad así como su inhibición por suero sin afectar de forma negativa a su acción antimicrobiana o neutralizante de LPS. Dichos péptidos derivados de LL-37 pueden ser por lo tanto beneficiosos para el tratamiento de sujetos con septicemia. (Ciornei *et al.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(7): 2845-2850; Bals *et al.*, J. Clin. Invest., 1999, 103: 1113-1117; Deslouches *et al.*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(8)3208-3216). Estos péptidos o sus derivados son ejemplos de moléculas de carga ideales para el vehículo de la presente invención.

*Protegrina-1 o PG-1*: (SEQ ID NO: 36: RGGRLCYCRRRFCVCVGR) y los derivados IB-367 o Iseganano: SEQ ID NO: 37: RGGLCYCRGRFCVCVGR (Chen *et al.*, Journal of Chromatography A, 853 (1999) 197-206; Jang *et al.*, BMC Structural Biology 2007, 7:21; van Saene *et al.*, van Saene et al., Chest, 2007, 132:1412; Kollef *et al.*, America, Journal of Respiratory and Critical care, 2006, 173; Shi *et al.*, Infection and Immunity, 1998, 66(8): 3611-3617. La familia de protegrina de péptidos antimicrobianos se identificó en leucocitos porcinos. Se han identificado ahora cinco secuencias de protegrina nativas (PG-1 a PG-5). Estas protegrinas nativas contienen de 16 a 18 aminoácidos, son muy homólogas y comparten la característica común de ser láminas beta anfipáticas, catiónicas. Las moléculas tienen enlaces disulfuro entre restos de cisteína en las posiciones 6 y 15 así como las posiciones 8 y 13. Iseganano, un péptido antimicrobiano, es activo contra bacterias grampositivas y gramnegativas aerobias y anaerobias, así como hongos y levaduras. Estos péptidos o sus derivados serán moléculas de carga ideales para el vehículo de la presente invención.

*K4*: (SEQ ID NO: 38: KKKKPLFGLFFGLF) es un péptido antimicrobiano diseñado usando la Base de Datos de Péptidos Antimicrobianos. Este péptido tiene fuerte actividad (lisa células bacterianas) contra bacterias grampositivas y gramnegativas incluyendo bacterias patógenas humanas tales como *Staphylococcus aureus* y algunas bacterias marinas del género *Vibrio*. El péptido no es tóxico para células de mamífero para concentraciones bacteriolíticas. (Duval *et al.*, Peptides, 2009, 30: 1608-1612). Este péptido o su derivado es un ejemplo de una molécula de carga para el vehículo de la presente invención.

*Indolicidina*: La Indolicidina es un péptido antimicrobiano de 13 aminoácidos presente en los gránulos citoplasmáticos de neutrófilos bovinos. La Indolicidina es un miembro de la familia de catelicidina de péptidos antimicrobianos aislados de células mieloides de mamífero. Como un péptido de origen natural, la indolicidina tiene una composición particular que consiste en 39 % de triptófano y 23 % de prolina (SEQ ID NO: 39: ILPWKWPWWPWRR-am; y variantes, SEQ ID NO: 40: ILPWKWPWWPWRR-met; SEQ ID NO: 41: ILKKWPWWPWRRK; SEQ ID NO: 42: ILKKWPWWPWRRK-met), y en la naturaleza el péptido está amidado en el extremo C. La Indolicidina tiene actividad contra bacterias grampositivas y gramnegativas, hongos y protozoos. Estos péptidos o sus derivados serán moléculas de carga ideales para el vehículo de la presente invención.

*Fragmento de Lactoferrina Humana* (hLF(1-11)): (SEQ ID NO: 43: GRRRRSVQWCA) La lactoferrina humana (hLF) es un componente principal de la defensa inespecífica de superficies de la mucosa y neutrófilos y está activo contra una diversidad de patógenos. Los estudios con péptidos sintéticos correspondientes a los primeros 11 aminoácidos N terminales, designados hLF(1-11), tienen la actividad bactericida. (Nebbering *et al.* Infection and Immunity, 2001, 69(3): 1469-1476). Este péptido o su derivado es un ejemplo de una molécula de carga para el vehículo de la presente invención.

*Polifemusina 1 y Taquiplesina I*: (SEQ ID NO: 44: RRWCFRVCYRGFCYRKCR-NH<sub>2</sub>, SEQ ID NO: 44: KWCFRVCYRGICYRRCR-NH<sub>2</sub>). Las Taquiplesinas son del cangrejo cacerola japonés *Tachypleus tridentatus* y las Polifemusinas son del cangrejo cacerola americano *Limulus polyphemus*. Estos péptidos son de 17-18 restos de aminoácidos de longitud, contienen dos enlaces disulfuro y tienen una arginina C terminal amidada. Ambas familias de péptidos poseen actividad antibacteriana, que inhibe el crecimiento de especies tanto Grampositivas como Gramnegativas, y hongos, además de una capacidad para prevenir la replicación de virus con envoltura tales como gripe A y VIH. Estos péptidos o sus derivados serán moléculas de carga ideales para el vehículo de la presente invención.

El *Interferón gamma* ( $pI=8,5-9,5$ ) es un interferón de tipo II que tiene actividad antivírica y puede usarse para el tratamiento de la infección por hepatitis y otras infecciones víricas. Los *interferones beta* ( $pI=8,9-9,7$ ) son interferones de tipo I que tienen actividad antivírica y pueden usarse para el tratamiento de infecciones por hepatitis. Estos interferones tienen puntos isoelectrónicos básicos y están entre las moléculas de carga ideales para el vehículo de la presente invención.

c) *Estimulantes de crecimiento (para el tratamiento de lesiones tisulares)*

PR39, *Factor Antiapoptótico* (SEQ ID NO: 31; H-Arg-Arg-Arg-Pro-Arg-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Pro-Phe-Phe-Pro-Pro-Arg-Leu-Pro-Pro-Arg-Ile-Pro-Pro-Gly-Phe-Pro-Pro-Arg-Phe-Pro-Pro-Arg-Phe-Pro - OH) se aisló originalmente del intestino de cerdo, este péptido de 39 aminoácidos rico en prolina y arginina también se encuentra en gránulos azurófilos de neutrófilos y macrófagos. Este péptido desempeña un papel en la movilidad celular y el potencial metastásico en la reparación de heridas; se une con la proteína del complejo de NADPH oxidasa p47phox7 y una proteína adaptadora de la señalización p130Cas. Además, recientemente, se ha descubierto que PR39 inhibe la apoptosis inducida por hipoxia y reduce la actividad caspasa-3 en células endoteliales. (Wu, J. *et al.* *Circulation* 109, 1660 (2004)). Los derivados de PR39 incluyen SEQ ID NO: 32: RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRI o PR26; SEQ ID NO: 33: RRRPRPPYLPRPRPPFFFP o PR19; SEQ ID NO: 34: RRRPRPPYLPR o PR11; y péptidos relacionados tales como SEQ ID NO: 35: RLCRIVVIRVCR o Bactenecina. (Agerberth, B. *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 202, 849-854, 1991; Boman, H.G. *et al.*, *Infect. Immun.*, 61, 2978-2984, 1993; Agerberth, B. *et al.*, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 54, 127-131, 1996; Gallo, R.L. *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 11035-11039, 1994; Li, J. *et al.*, *Circ. Res.*, 81, 785-796, 1997; Gudmundsson, G.H. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7085-7089, 1995; Li, J. *et al.*, *Nature. Med.*, 6, 49-55, 2000; Li, J. *et al.*, *Nature. Med.*, 6, 356, 2000; Gao, Y. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 106, 439-448, 2000; Bao, J. *et al.* *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 281, 2612-2618, 2001; Madhani *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1588 (2002) 232-240). Estos péptidos o sus derivados serán moléculas de carga ideales para el vehículo de la presente invención.

Péptido activador de TGF beta. Un péptido activador del Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) derivado de trombospondina (TSP-1). Este motivo básico (SEQ ID NO: 46) H-Lys-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> (KRFK) en combinación con secuencias Trp-Xaa-Xaa-Trp induce fuerte unión a heparina. Esta secuencia Trp-Xaa-Xaa-Trp es los aminoácidos 412-415 de TSP-1 y es suficiente para activar TGF- $\beta$  latente. (Shultz-Cherry, S. *et al.* *J. Biol. Chem.* 270, 7304 (1995); Guo, N. *et al.* *J. Biol. Chem.* 267, 19349 (1992)). Son ejemplos de secuencias procedentes del motivo anterior SEQ ID NO: 48 (H-Lys-Arg-Phe-Lys-Gln-Asp-Gly-Gly-Trp-Ser-His-Trp-Ser-Pro-Trp-Ser-Ser-OH; o KRFKQDGGWSHWSPSS) y SEQ ID NO: 49 (H-Lys-Arg-Phe-Lys-Gln-Asp-Gly-Gly-Trp-Ser-His-Trp-Ser-Pro-OH; o KRFKQDGGWSHWSP). Estos péptidos o sus derivados serán moléculas de carga ideales para el vehículo de la presente invención.

*d) Inhibidor del crecimiento (para el tratamiento del cáncer y crecimiento en exceso de células o cicatrices)*

Los *interferones alfa* ( $pl=8,8-9,1$ ) son interferones de tipo I que pueden ser útiles para el tratamiento de algunos tipos de cáncer. Pueden usarse interferones alfa para tratar el cáncer del riñón, melanoma maligno, melanoma cutáneo, mieloma múltiple y tumores carcinoides. También puede usarse para tratar determinados tipos de linfoma y leucemia. El *Interferón gamma* ( $pl=8,5-9,5$ ) es un interferón de tipo II que tiene actividad anti-cicatrizal (suprime el exceso de crecimiento/actividad de células formadoras de cicatrices) y puede usarse para el tratamiento de cirrosis hepática, cirrosis pulmonar, enfermedad granulomatosa crónica, osteopetrosis y cicatrización inducida por *Mycobacterium*. La cicatrización o el exceso de depósitos de tejido conectivo pueden estar provocados por productos químicos o infecciones.

*Inhibidores de TGF-beta* procedentes de o que comprenden una cualquiera de las SEQ ID NO: 56 (FCLGPCPYIWSLDT o Tb<sub>143-56</sub>), SEQ ID NO: 57 (TSLDASIWAMMQNA o P144), SEQ ID NO: 58 (KRIWFIPRSSWYERA o P17) y SEQ ID NO: 58 (TSLDATMIWTMM). Estos péptidos pueden modificarse para contener restos básicos para poder unirse con el vehículo de la presente invención, con la composición resultante que será útil para el tratamiento de cirrosis hepática, fibrosis pulmonar, enfermedad granulomatosa crónica, osteopetrosis y cicatrización inducida por *Mycobacterium*.

*Inhibidor de bFGF* (SEQ ID NO: 50; H-Lys-Arg-Thr-Gly-Gln-Tyr-Lys-Leu-OH): Este péptido corresponde a restos humanos, bovinos (119-126), de ratón, de rata (118-125) y de Factor de Crecimiento de Unión a Heparina 2 (118-125) de bFGF. Inhibe la dimerización y activación de receptores de bFGF. (Yayon, A. *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 10643 (1993)). Este péptido o su derivado es un ejemplo de una molécula de carga para el vehículo de la presente invención.

*Péptido derivado del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2)*: FGF-2 es un factor de crecimiento autocrino en la proliferación autónoma de células de glioma. El péptido derivado de FGF-2 (SEQ ID NO: 51; H-Met-Trp-Tyr-Arg-Pro-Asp-Leu-Asp-Glu-Arg-Lys-Gln-Gln-Lys-Arg-Glu-OH) suprime el crecimiento de glioma maligno. Este péptido de 16 restos tiene similitud conformacional con el dominio de unión a receptor potencial de FGF-2. Suprime el crecimiento de células de glioma humano y es un nuevo producto de tratamiento potencial para el glioma maligno (Kono, K. *et al.* *J. Neuro-Oncology* 63, 163 (2003)). Este péptido o su derivado es un ejemplo de una molécula de carga para el vehículo de la presente invención.

*Caribdotoxina* (SEQ ID NO: 52; Pyr-Phe-Thr-Asn-Val-Ser-Cys-Thr-Thr-Ser-Lys-Glu-Cys-Trp-Ser-Val-Cys-Gln-Arg-Leu-His-Asn-Thr-Ser-Arg-Gly-Lys-Cys-Met-Asn-Lys-Lys-Cys-Arg-Cys-Tyr-Ser-OH (Enlace disulfuro: 7-28, 13-33 y 17-35)): Caribdotoxina (ChTX) es un bloqueador de canal K<sup>+</sup> activado por Ca<sup>2+</sup>. Despolariza linfocitos T periféricos y bloquea su proliferación inducida por mitógeno. ChTX es un péptido muy básico aislado del veneno del escorpión, *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. (Leonard, R. *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10094 (1992); Giménez-Gallego, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 3329 (1988). Sugg, E. *et al.* *J. Biol. Chem.* 265, 18745 (1990)). Este péptido o su

derivado es un ejemplo de una molécula de carga para el vehículo de la presente invención.

*Péptido de Fusión de Antennapedia Bak BH3 (Ant-BH3) (71-89)* (SEQ ID NO: 53: H-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Met-Gly-Gln-Val-Gly-Arg-Gln-Leu-Ala-Ile-Ile-Gly-Asp-Asp-Ile-Asn-Arg-Arg-Tyr-OH). Este es un péptido de fusión que contiene el fragmento de aminoácidos 71 a 89 del dominio de Bak BH3 fusionado con el péptido antennapedia. El dominio de homología 3 de Bcl-2 (BH3) es crucial para las propiedades inductoras de muerte y de dimerización de los miembros proapoptóticos de la familia de proteínas de Bcl-2, incluyendo Bak, Bax y Bad. Los péptidos sintéticos correspondientes al dominio BH3 de Bak se unen con Bcl-xL, antagonizan su función antiapoptótica e inducen rápidamente la apoptosis cuando se suministran a células intactas mediante fusión con el dominio de internalización de homoproteína antennapedia. Holinger, E. *et al.* J. Biol. Chem. 274, 13298 (1999). Este péptido o su derivado es un ejemplo de una molécula de carga para el vehículo de la presente invención.

*Péptido Proapoptótico dirigido a Tumores:* (SEQ ID NO: 54: H-Cys-Asn-Gly-Arg-Cys-Gly-Gly-D-Lys-D-Leu-D-Ala-D-Lys-D-Leu-D-Ala-D-Lys-D-Lys-D-Leu-D-Ala-D-Lys-D-Leu-D-Ala-D-Lys-NH<sub>2</sub> (con enlace disulfuro intrapeptídico y la D representa isómero D del aminoácido). Este es igual que CNGRCGGklaklaklaklak-NH<sub>2</sub> (Enlace disulfuro) o CNGRCGG-(klaklak)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (con enlace disulfuro intrapeptídico) donde los códigos de aminoácidos de letras minúsculas representan el isómero D de los aminoácidos correspondientes. Este péptido consiste en dos dominios funcionales, por un lado un dominio "guiado" o de dirección que guía al péptido a células diana y permite su internalización y por otro lado una secuencia inductora de muerte celular programada. El dominio de dirección contiene el motivo Asn-Gly-Arg (NGR) que ha demostrado ser útil para suministrar diversos compuestos antitumorales y partículas víricas a vasos tumorales. Como secuencia inductora de muerte celular programada se seleccionó el péptido de 14 aminoácidos sintético klaklaklaklak, también denominado (klaklak)<sub>2</sub>, debido a que destruye bacterias a concentraciones 1 % de las requeridas para destruir células eucariotas. Este dominio proapoptótico no es tóxico fuera de las células, pero es tóxico cuando se internaliza en células diana mediante la alteración de membrana mitocondriales. Por lo tanto, los péptidos proapoptóticos dirigidos representan una nueva clase potencial de agentes antineoplásicos. Combinan dos niveles de especificidad: "guiado" a células diana y apoptosis selectiva de dichas células después de la entrada. (H.M. Ellerby *et al.*, Nat. Med., 5, 1032 (1999); G.Colombo *et al.*, J. Biol. Chem., 277, 47891 (2002); L.A. Plesniak *et al.*, Protein Sci., 13, 1988 (2004)). Este péptido o su derivado es un ejemplo de una molécula de carga para el vehículo de la presente invención. Las secuencias presentadas en la Tabla 1 se basan en la abreviatura de una letra para cada aminoácido conocida en la técnica y los aminoácidos representados pueden ser isómeros D o L. "Pyr" indica piroglutamato, "am" indica aminado en el extremo carboxilo y "met" indica metilación.

**Tabla 1: Ejemplos de moléculas de carga peptídicas como elementos de la presente invención. Péptido antiinflamatorios (para Diabetes, AR, enfermedad de Crohn, EM, etc.)**

ID NO.	Secuencia	Nombre/derivado de/(acción)
1	KKKKKKKKK-GG-TALDWSWLQTE	IKK inh./NBD/(acc en bl NFkB)
2	DRQIKIWFQNRRMKWKK-TALDWSWLQTE	IKK inh./NBD(acc en bl NFkB)
3	RRRRRRRRR-GG-TALDWSWLQTE	IKK inh./NBD(acc en bl NFkB)
4	YGRKKRRQRRRG-TTLDWSWLQME	IKK inh./NBD/(acc en bl NFkB)
5	YGRKKRRQRRRRPK-RPTTLNLF	JNK inh (sin acc en AP1)
6	RRRRRRRRR-RPTTLNLF	JNK inh (sin acc en AP1)
7	DRQIKIWFQNRRMKWKK-QLRRPSDRELSE	NFkB inh. (apoptótico)P65-P1
8	RRRRRRRRR-QLRRPSDRELSE	NFkB inh. (potenciación de la apoptosis)
9	RRRRRRRRR-VQRKRQKLMP	Inh de trans de NFkB nuclear
10	RRRRRRRRR-DDRHDSGLDSMKDE-am	IKK inh. (acc en bl NFkB)
11	Pvr-EGAPPQSARRDRMPCRNFFWKTFSSCK	Cortistatina (tipo somatostatina)

(continuación)

<b>Péptidos antiinfecciosos</b>		
ID NO.	Secuencia	Nombre/derivado de/acción
12	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS	Magainina1
13	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	Magainina2
14	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAWGQATQIAK	Cecropina A
15	KWKVFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAKAL	Cecropina B
16	ALYKLLKLLKLSAKKLG	C18G (Factor plaquetario 4)
17	KFHEKHHSRGRY	Histatina 8
18	DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSRGRY	Histatina 5
19	DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSRGRYSNYLYDN	Histatina 3
20	AKRHHGYKRKFH-am	P-1 derivado de histatina 13
21	ACYCRIPACI-AGERRYGTCTI-YQGRLWAFCC (S-S;2-30, 4-19, 9-29)	<i>Defensina HNP-1</i>
22	GNNRPVYIPQPRPPHPRI	Apidaecina IA
23	VDKGSYLPRPTPPRPIYNRN	Pirrocoricina
24	(KLAKLAK) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	KP1; Más potente que 12-15, menos tox en células 3T3
25	(KLAKLAK) <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub>	
26	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	LL-37
27	GDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	F-106 de LL37
28	RKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	F-110 de LL37
29	KLFRKIVKRILKFLRKLKLV	LLKKK de LL37
30	GRFKRFRKFKKLFKLLSPVIPLHL-am	Catelicidina Bovina BMAP-27
31	RRRPRPPYLPRPRPPPPFFPRLPPRIPPGFPPRFPPRFPP	PR39 (también estimulante del crecimiento)
32	RRRPRPPYLPRPRPPPPFFPRLPPRI	PR26 de PR39
33	RRRPRPPYLPRPRPPPPFFP	PR19 de PR39
34	RRRPRPPYLPR	PR11 de PR39
35	RLCRIVVIRVCR; con enlace disulfuro intramolecular	Bactenecina
36	RGGRLCYCRRRFCVVCVGR	Protegrina 1 (Jang 07; fr Sepsis; Steinstraesser 2003)
37	RGGLCYCRGRFCVVCVGR	IB-367; Iseganano
38	KKKKYLFGLFFGLF	K4
39	ILPWKWPWWPWRR-am	Indolicidina (Falla 1996 y 1997)
40	ILPWKWPWWPWRR-met	Indolicidina-C
41	ILKKWPWWPWRRK	C11 de Indolicidina
42	ILKKWPWWPWRRK-met	C11-C de Indolicidina
43	GRRRRSVQWCA	hLF(1-11) de lactoferrina humana
44	RRWCFRVCYRGFCYRKCR-NH <sub>2</sub>	Polifemusina I
45	KWCFRVCYRGICYRRCR-NH <sub>2</sub>	Taquiplesina I
<b>Estimulante del crecimiento</b>		
ID NO.	Secuencia	Nombre/derivado de/acción
46	KRFK	Agente de unión de Heparina
47	KRFK-(Xaa) <sub>y</sub> -W-Xaa-Xaa-W; donde Xaa = cualquier aminoácidos e y es 0-10.	Activador de TGF-beta (TSP-1)
48	KRFKQDGGWSHWSPWSS	Activador de TGF-beta (TSP-1)
49	KRFKQDGGWSHWSP	Activador de TGF-beta (TSP-1)
(31)	RRRPRPPYLPRPRPPPPFFPRLPPRIPPGFPPRFPPRFPP	PR39, Antiapoptótico (para septicemia)
(32)	RRRPRPPYLPRPRPPPPFFPRLPPRI	PR26 de PR39
(33)	RRRPRPPYLPRPRPPPPFFP	PR19 de PR39
(34)	RRRPRPPYLPR	PR11 de PR39



(continuación)

<b>Inhibidores del crecimiento celular o inhibidores del crecimiento de cicatrices o agentes proapoptóticos</b>		
ID NO.	Secuencia	Nombre/derivado de/acción
50	KRTGQYRL	Inhibidor de bFGF; prevención de dímeros
51	MWYRPDLDERKQQKRE	Inhibidor de FGF-2; anti-glioma
52	PyrFTNVSCSTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS (S-S; 7-28, 13-33 y 17-35); Pyr es piroglutamato	Caribdotoxina; bloquea linf T
53	RQIKIWFQNRMRMKWKKMGQVGRQLAIIGDDINRRY	Fusión Ant-BH3; proapoptótico mediante bloqueo de Bcl-2 antiapoptótico (BclxL)
54	CNGRCGCKlaklaklaklak-NH <sub>2</sub> ; en minúscula están los aminoácidos D para prevenir la degradación; con enlaces disulfuro	Péptido Proapoptótico dirigido a tumores
55	CNGRC-GG-KLAKLAKKLAKLAK-am; con enlaces disulfuro	Péptido Proapoptótico dirigido a tumores
56	FCLGPCPYIWSLDT	Tb <sub>143-56</sub> (anti-TGF beta)
57	TSLDASIWAMMQNA	P144 (anti-TGF beta)
58	KRIWFIPRSSWYERA	P17 (anti-TGF beta)
59	TSLDATMIWTMM	P54 (anti-TGF beta)

La proteína y el péptido unidos de forma electrostática al vehículo según la presente invención pueden dar como resultado circulación más larga en el cuerpo, más estabilidad en la sangre y/o administración más conveniente (por ejemplo, administraciones más rápidas tales como mediante embolada en lugar de infusión y administraciones menos frecuentes, por ejemplo, una vez cada varios días en lugar de infusión o una vez al día). Con frecuencia la administración crónica de un agente activo proteico básico puede ser inmunogénica. Las formulaciones basadas en vehículo dan como resultado en general menos inmunogenicidad que sistemas de suministro basados en PEG de modo que se espera que la proteína o el péptido básicos sean menos inmunogénicos en composiciones de las presentes invenciones. La "PEGilación Directa" del agente activo es la unión directa de la proteína con PEG y puede dar como resultado pérdida de actividad. Una proteína o un péptido catiónico unidos electrostáticamente con grupos aniónicos que están unidos covalentemente a la cadena principal del vehículo con cadenas laterales protectoras, sin embargo, pueden dar como resultado una alternativa estable, de circulación a largo plazo, a la PEGilación. En una realización, la interacción entre la molécula de carga y el grupo aniónico de la composición es más estable en sangre que la interacción entre la molécula de carga y grupos hidrófobos que pueden ser elementos de la composición. Los vehículos de la presente invención pueden actuar como un crioprotector y estabilizador macromolecular que conservan el agente activo proteico o peptídico básico en solución así como durante el proceso de liofilización y reconstitución.

Aunque las combinaciones de proteína o péptido/vehículo unidas de forma electrostática se describen en el presente documento como composiciones, pueden, como alternativa, entenderse como compuestos que incluyen enlaces electrostáticos. En diversas realizaciones de la invención, pueden excluirse componentes no enumerados en el presente documento que pueden alterar el funcionamiento de la invención permitiendo al mismo tiempo la inclusión de componentes que no alteran el funcionamiento de componentes necesarios. Los elementos no enumerados en el presente documento que pueden alterar el funcionamiento de la invención pueden excluirse mediante el uso de la expresión "que consiste esencialmente en" al describir los elementos necesarios de la invención. Sin embargo, el uso de la expresión "que consiste esencialmente en" no excluye elementos que no alteren el funcionamiento de los componentes necesarios. En una realización "que consiste esencialmente en" significa que la Kd para interacciones iónicas es menor de 10  $\mu$ M y ninguna otra interacción, tal como interacciones hidrófobas, tendrá una Kd menor de 10  $\mu$ M.

### 30 Liberación sostenida:

Cuando el vehículo de la presente invención se usa para formular un agente activo proteico o peptídico, se observará una liberación del agente activo durante un periodo prolongado como evidente a partir de la presencia sostenida del agente activo en la sangre en comparación con la administración del agente activo solo. La asociación del vehículo con el agente activo se define por la constante de disociación específica (Kd) que puede ser determinada fácilmente por los expertos en la materia. La liberación se determinará por la concentración de agente activo libre de modo que cuando la concentración de agente activo libre desciende (debido a la degradación o eliminación por el cuerpo) y ya no se cumple la Kd, se liberará más agente activo para cumplir la Kd. La Kd es el producto de la concentración de agente activo libre y la concentración de agrupamientos aniónicos (no asociados con el agente activo) dividida por la concentración del agente activo asociado con grupos aniónicos. Para las composiciones de la presente invención que forman estructuras supramoleculares tales como micelas, liposomas y otras estructuras, la tasa de liberación aún seguirá la Kd pero debido a la compartimentalización la Kd solamente se cumplirá en cada compartimento específico. Sin embargo, la mezcla a largo plazo de los diversos compartimentos dará como resultado liberación con el tiempo del agente activo al ambiente circundante. En ambos casos tanto si está implicada o no compartimentalización, un

perfil de liberación dará como resultado suministro prolongado (durante, por ejemplo de 1 a aproximadamente 4.000 horas, o como alternativa de aproximadamente 4 a aproximadamente 1500 horas) de cantidades eficaces (por ejemplo, de aproximadamente 0,00001 mg/kg/hora a aproximadamente 10 mg/kg/hora) del agente activo. La ventaja de la formulación es administración por embolada menos frecuente de continua a una vez al día o incluso una vez a la semana. Esto proporcionará un nivel más constante de agente activo en la sangre con menos fluctuación en comparación con un agente activo no formulado. La frecuencia de administración de embolada variará según las necesidades del sujeto y puede ser determinada fácilmente por los expertos en la materia. Sin desear quedar ligado a la teoría, en una realización, una ventaja de la invención con respecto a un vehículo que contiene un resto hidrófobo está en el proceso de fabricación de la presente invención, que puede permitir el uso de agua sin la necesidad de disolventes orgánicos. Los sistemas acuosos pueden representar una ventaja de fabricación significativa.

#### Usos terapéuticos

Un "paciente", "sujeto" u "hospedador" para tratar con la composición de la presente invención puede significar un ser humano o animal no humano. Las proteínas básicas (proteína catiónica) de la presente invención son útiles en el tratamiento de dichas enfermedades y trastornos tales como, pero sin limitación, infecciones bacterianas, cáncer y enfermedades neoplásicas relacionadas, y enfermedad de Alzheimer. Las composiciones de la presente invención pueden usarse en la fabricación de un medicamento para cualquier variedad de usos, incluyendo por ejemplo, tratar cualquier enfermedad u otra afección tratable de un sujeto.

#### A) Tratamiento de la inflamación

La composición de la presente invención con molécula de carga que comprende las SEQ ID NO: 1-11 o sus derivados o análogos puede usarse para tratar la inflamación. Son ejemplos de enfermedades inflamatorias crónicas que pueden beneficiarse de la composición de la presente invención: artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino crónica, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y diabetes.

#### B) Tratamiento de infecciones

La composición de la presente invención con molécula de carga que comprende las SEQ ID NO: 12-45 o sus derivados o análogos puede usarse para tratar infecciones. Las proteínas básicas de la presente invención son útiles en el tratamiento de infecciones bacterianas. Los agentes activos ilustrativos para tratamiento incluyen lisostafina, una proteína básica que tiene carga positiva global a pH fisiológico. La lisostafina escinde cruces de pentaglicina en el peptidoglucano de la pared celular de bacterias grampositivas. *S. aureus* es particularmente susceptible a los efectos bacteriolíticos de esta enzima ya que su pared celular contiene una alta proporción de cruces de pentaglicina. La lisostafina es una terapia sistémica potencial para tratar infecciones mediadas por *S. aureus* multiresistentes incluyendo endocarditis, osteomielitis, infecciones relacionadas con el catéter y furunculosis y neumonía adquiridas en la comunidad mediadas por MRSA.

#### C) Tratamiento de daño tisular o celular

En una realización, las proteínas básicas de la presente invención incluyen Factor de Crecimiento Transformante (TGF-alfa, beta-1, beta-2, beta 3; pl 8-9), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A, -B, -C, -D; pl 8,0-9,5), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, con 22 miembros; pl 8,0-9,0), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF; tiene sitios positivos que se unen con restos de sulfato), factor de crecimiento nervioso (NGF, pl 8,5-9,5) y un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-AA, -BB, -AB; pl 8,5-10). Estos factores de crecimiento son útiles en la estimulación del crecimiento de órganos lesionados tales como islotes pancreáticos en el caso de diabetes o corazón en el caso de infarto de miocardio. Estos factores de crecimiento pueden formularse o combinarse con el vehículo de la presente invención y usarse para el tratamiento de la diabetes o el infarto de miocardio. Las proteínas anteriores tienen una carga positiva global a pH fisiológico o tienen una parcela de carga positiva y son capaces de unirse con los grupos aniónicos del vehículo de la presente invención. Otros miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF) incluyendo EGF de unión a heparina (HB-EGF), Betacelulina (BTC), Anfirregulina (AR), Epiregulina (EPR), Epígeno (EPR) y neuroregulina tienen sitios de unión capaces de unirse con restos de sulfato y pueden formularse usando el vehículo de la presente invención. Pueden usarse TGF-alfa, VEGF y HB-EGF para hacer crecer células de islotes en diabetes. La composición de la presente invención con molécula de carga que comprende las SEQ ID NO: 31-34 y 46-49 o sus derivados o análogos pueden usarse para tratar el daño tisular o celular. En otra realización más, la molécula de carga de la presente invención puede ser una cualquier de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF; pl 9,6); factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) o eritropoyetina sin ácido siálico (pl 8,5). Todos los miembros de la familia FGF tienen un punto isoeléctrico básico o tienen parcelas de cargas positivas en su superficie que pueden unirse con grupos aniónicos en el vehículo de la presente invención. Estos factores de crecimiento son útiles para el tratamiento de lesiones por radiación o químicas que requiere la regeneración de órganos. Por ejemplo, la exposición accidental a radiación se beneficiará del uso de FGF a largo plazo (una formulación de FGF con vehículo de núcleo aniónico de la presente invención) que mejorará la regeneración de la mucosa intestinal y la médula ósea. La formulación de eritropoyetina en el vehículo de núcleo aniónico de la presente invención será útil para el tratamiento de daño de la médula ósea o colapso por aceleración de la recuperación de la médula ósea, especialmente cuando el nivel de eritropoyetina se mantiene durante un periodo de tiempo prolongado debido al

vehículo de la presente invención.

*D) Tratamiento de cáncer o exceso de crecimiento*

- 5 La composición de la presente invención con molécula de carga que comprende las SEQ ID NO: 50-55 o sus derivados o análogos puede usarse para tratar el cáncer o el exceso de crecimiento.

**Administración y Dosificaciones**

- 10 Un "paciente", "sujeto" u "hospedador" para tratar con la composición de la presente invención puede significar un ser humano o animal no humano.

La expresión "excipiente farmacéuticamente aceptable" está reconocida en la técnica y se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, disolvente o material encapsulante administrado junto con la composición. Cada excipiente es "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes del complemento y no perjudicial para el sujeto. Algunos ejemplos de materiales que pueden actuar como excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetil celulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) goma arábiga en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua apirógena; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones de tampón de fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

La dosificación del agente activo o peptídico/proteico de la presente invención variará dependiendo de los síntomas, la edad y el peso corporal del sujeto, la naturaleza y la gravedad de la enfermedad o el trastorno, la vía de administración y otros fármacos/agentes activos que se administran al sujeto en conjunto. La dosificación debería proporcionarse siempre para asegurar que el beneficio del péptido/proteína supera el riesgo para el sujeto con respecto a toxicidad y otros efectos secundarios. En casos en los que el agente activo es lisostafina, la dosificación dependerá de la gravedad de las infecciones, y la forma de otros antibióticos complementarios. En casos en los que el agente activo es agente antiinflamatorio, la dosificación dependerá de la gravedad de la inflamación y la causa de la inflamación, y la forma de otros fármacos antiinflamatorios complementarios. En casos en los que el agente activo es factor de crecimiento, la dosificación dependerá de la seguridad y tolerabilidad del factor de crecimiento y el beneficio supera el riesgo, y si el factor de crecimiento se usa solo o en combinación con otro factor de crecimiento y agente inductor del factor de crecimiento tal como Omeprazol, en el caso de la diabetes. Cualquiera de las formulaciones objeto pueden administrarse en una única dosis o en dosis divididas. Las dosificaciones para la formulación de péptido/proteína de la presente invención pueden determinarse fácilmente mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia o como se enseña en el presente documento. Además, la presente invención contempla mezclas de una o más de las formulaciones de la presente invención junto con uno o más antibióticos u otros agentes terapéuticos. En casos particulares el vehículo que contiene lisostafina de la presente invención puede administrarse junto con uno cualquiera o más de otros antibióticos seleccionados de: amoxicilina, ampicilina, azidocilina, azlocilina, aztreonam, bacitacina, benzatina bencilpenicilina, benzatina fenoximetilpenicilina, bencilpenicilina (G), biapenem, carbenicilina, cefacetilo, cefadroxilo, cefalexina, cefaloglicina, cefalonio, cefaloridina, cefalotina, cefapirina, cefaticina, cefacedona, cefazaflur, cefazolina, cefradina, cefroxadina, ceftazolidina, cefaclor, cefamandol, cefminox, cefonicida, ceforanida, cefotiam, cefprocilo, cefbuperazona, cefuroxima, cefuzonam, cefamicina (tal como cefoxitina, cefotetano, cefmetazol), carbacefem (tal como loracarbef), cefcapeno, cefdaloxima, cefdinir, cefditoreno, cefetamet, cefixima, cefmenoxima, cefodidima, cefoperazona, cefotaxima, cefpimizol, cefpiramida, cefpodoxima, cefsulodina, ceftacidima, cefteteram, ceftibuteno, ceftioleño, ceftizoxima, ceftriaxona, oxacefem (tal como flomoxef, latamoxef), cefepima, ceftazolidina, cloranfenicol, clorhexidina, clindamicina, clometocilina, cloxacilina, colistina, cicloserina, daptomicina, doripenem, doxiciclina, epicilina, ertapenem, eritromicina, faropenem, fostomicina, gentamicina, imipenem, linazolidina, mecilina, meropenem, metilpenicilina, metilpenicilina, mezlocilina, minociclina, mupirocina, nafcilina, neomicina, oxacilina, panipenem, penamecilina, feneticilina, fenoximetilpenicilina (V), piperacilina, polimixina, polimixina B, procaína bencilpenicilina, propicilina, quinupristina/dalfopristina, ramoplanina, rifampicina, rifampina, sulbencilina, teicoplanina, tigeciclina, tigemonam, trimetoprim/sulfametoxazol y vancomicina. En realizaciones particulares, el vehículo que contiene proteínas básicas de la presente invención puede administrarse junto con uno cualquiera o más de antibióticos adicionales seleccionados de: aztreonam, bacitacina, ceftazolidina, cloranfenicol, clorhexidina, clindamicina, daptomicina, doxiciclina, eritromicina, gentamicina, linezolidina, metilpenicilina, minociclina, mupirocina, neomicina, oxacilina, polimixina, quinupristina/dalfopristina, rifampicina, rifampina, teicoplanina, temociclina, ticarcilina, tigeciclina, trimetoprim/sulfametoxazol y vancomicina. En realizaciones particulares, el vehículo que contiene proteínas básicas de la presente invención puede administrarse junto con cualquier antibiótico glucopeptídico en relaciones en peso de proteína básica con respecto a antibiótico glucopeptídico que varían de 0,1:1 a 20:1. En realizaciones particulares, el intervalo de relaciones en peso es de 0,5:1 a 7:1. El antibiótico glucopeptídico puede seleccionarse del grupo que

consiste en vancomicina, teicoplanina y ramoplanina. La composición de la presente invención puede estar en una forma adecuada para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intratecal o tópica.

También desvela un método para tratar una infección estafilocócica en un sujeto humano que comprende: administrar la composición de la presente invención que contiene un vehículo con carga aniónica que está unido electrostáticamente con lisostafina; en donde se administra lisostafina en una cantidad de 1 mg a 150 mg/kg de peso corporal/día al sujeto humano; y administrar un antibiótico beta-lactámico en una cantidad de 50 a 250 mg/kg de peso corporal/día al sujeto humano. El antibiótico beta-lactámico puede administrarse junto con el vehículo y lisostafina; de modo que la dosis de beta-lactama en el sujeto humano es antibiótico de 100 a 200 mg/kg de peso corporal/día. El antibiótico beta-lactámico puede ser una penicilina, una cefalosporina, penem, un carbapenem o una monobactama. Los antibióticos beta-lactámicos que pertenecen a penicilinas incluyen: aminopenicilinas (tales como amoxicilina, ampicilina y epicilina); carboxipenicilinas (tales como carbenicilina, ticarcilina, temocilina); ureidopenicilinas (azlocilina, piperacilina, mezlocilina); y otras: (tales como mecilnam, sulbenicilina, bencilpenicilina (G), azidocilina, penamecilina, clometocilina, benzatina bencilpenicilina, procaína bencilpenicilina, fenoximetilpenicilina (V), propicilina, benzatina, fenoximetilpenicilina, feneticilina, oxacilina, cloxacilina, meticilina, nafcilina). Los antibióticos beta-lactámicos que pertenecen a cefalosporinas son: cefacetrilo, cefadroxilo, cefalexina, cefaloglicina, cefalonio, cefaloridina, cefalotina, cefapirina, cefatrizina, cefazedona, cefazafur, cefazolina, cefradina, cefroxadina, ceftazol, cefaclor, cefamandol, cefminox, cefonicida, ceforanida, cefotiam, cefprozilo, cefbuperazona, cefuroxima, cefuzonam, cefamicina, carbacefem, cefcapeno, cefdaloxima, cefdinir, cefditoreno, cefetamet, cefixima, cefmenoxima, cefodizima, cefoperazona, cefotaxima, cefpimizol, cefpiramida, cefpodoxima, cefsulodina, ceftazidima, cefteram, ceftibuteno, ceftioleño, ceftizoxima, ceftriaxona, oxacefem, cefepima, ceftozoprano, cefpiroma, cefquinoma, y ceftobiprol. Los antibióticos beta-lactámicos que pertenecen a carbopenémicos son: biapenem, doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem y panipenem. El antibiótico beta-lactámico que es penémico es faropenem.

En casos determinados, la dosificación de una formulación de péptido/proteína estará en general en el intervalo de aproximadamente 0,01 ng a aproximadamente 1000 mg de proteína básica por kg de peso corporal, específicamente en el intervalo de aproximadamente 1 ng a aproximadamente 100 mg de proteína básica por kg, y más especialmente en el intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 20 mg de proteína básica por kg. El intervalo de dosis más preferible será de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 20 mg de proteína básica por kg. La cantidad de péptido/proteína en relación con el peso del vehículo en una formulación puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 % a 1000 % del peso del vehículo. En un caso la cantidad de proteína básica proteína en relación con el peso del vehículo en una formulación puede estar en el intervalo de aproximadamente 5 % a 500 % del peso del vehículo. En otros casos la cantidad de proteína básica en relación con el peso del vehículo en una formulación puede estar en el intervalo de aproximadamente 10 % a 100 % del peso del vehículo.

Puede ser necesario identificar una dosis o cantidad y cualquier posible efecto en el momento de la administración de la formulación. Esto puede conseguirse mediante experimentación rutinaria como se describe en el presente documento, usando uno o más grupos de animales (preferentemente al menos 5 animales por grupo), o en ensayos animales si es apropiado. La eficacia de la formulación de péptido/proteína puede evaluarse administrando y evaluando el efecto de la administración midiendo uno o más índices asociados con la enfermedad/trastorno/infección de interés y comparando los valores postratamiento de estos índices con los valores de los mismos índices antes del tratamiento.

El momento preciso de la administración y la cantidad de cualquier compuesto particular que producirá el tratamiento más eficaz en un sujeto dado dependerá de la actividad, farmacocinética y biodisponibilidad de la proteína básica, condición fisiológica del sujeto (incluyendo edad, sexo, tipo y estadio de la enfermedad, condición física general, sensibilidad a una dosificación y tipo de medicación dados), vía de administración y similares. Las directrices presentadas en el presente documento pueden usarse para optimizar el tratamiento, por ejemplo, determinar el momento y/o cantidad de administración óptimos, lo que requerirá solamente experimentación rutinaria consistente en supervisar el sujeto y ajustar la dosificación y/o el momento.

El tratamiento puede iniciarse con dosificaciones menores que son menores que la dosis óptima del compuesto. A continuación, la dosificación puede aumentarse en incrementos pequeños hasta que se obtenga el efecto terapéutico óptimo.

El uso combinado de la formulación de lisostafina de la presente invención con otros antibióticos u otros agentes terapéuticos puede reducir la dosificación necesaria para la formulación de lisostafina. Esto se debe a que el efecto de otros antibióticos u otros agentes terapéuticos puede ser complementario del efecto de la formulación de lisostafina. En dicha terapia combinada, los diferentes agentes activos pueden suministrarse juntos o por separado, y simultáneamente o en momentos diferentes en el día.

La toxicidad y eficacia terapéutica de la formación de péptido/proteína antibacteriana de la presente invención pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL<sub>50</sub>, DE<sub>50</sub>, CIM (Concentración mínima del producto que aún inhibirá el crecimiento de un microorganismo de ensayo) y/o CBM (Concentración mínima del producto que destruirá un organismo de ensayo o será bactericida para un organismo de ensayo). Se prefieren formulaciones que muestren

índices terapéuticos grandes. Aunque pueden usarse formulaciones que muestran efectos secundarios tóxicos, debería tenerse cuidado de que el complejo del vehículo-péptido/proteína antibacteriano se acumule en el sitio deseado para reducir los efectos secundarios.

5 Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. Es importante que la dosificación de cualquier formulación de complejo de vehículo-péptido/proteína antibacteriano proporcione una serie de concentraciones en circulación en la sangre que estén por encima de la CIM con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para agentes de la presente invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo bacteriano para obtener la CIM y CBM. Una dosis de la formulación puede obtenerse de modelos animales basándose en la dosis que proporciona un intervalo de concentración en plasma en circulación por encima de la CIM y/o CBM como se determina en cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar con más precisión dosis útiles en seres humanos.

15 El complejo de vehículo-péptido/proteína antibacteriano de la presente invención puede usarse para administración externa en forma de pomada, pasta, crema o geles y puede contener además excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, goma arábiga, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos.

20 El vehículo con proteínas básicas de la presente invención puede usarse para administración externa en forma de polvo o pulverización y puede contener además excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Las pulverizaciones pueden contener adicionalmente propulsores habituales tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos no sustituidos volátiles, tales como butano y propano.

30 El complejo de vehículo-péptido/proteína de la presente invención puede usarse para administración externa en forma de aerosol. Esto se consigue preparando un aerosol acuoso, preparación liposómica o partículas sólidas que contienen la composición de la presente invención pero no unidos covalentemente al sólido. Podría usarse una suspensión no acuosa (por ejemplo, propulsor de fluorocarburo). Pueden usarse nebulizadores sónicos debido a que minimizan la exposición del agente a corte, lo que puede dar como resultado la degradación del compuesto. Habitualmente, se prepara un aerosol acuoso formulando una solución o suspensión acuosa de la formulación junto con vehículos y estabilizadores farmacéuticamente aceptables convencionales. Los excipientes y estabilizadores varían según las necesidades del compuesto particular, pero normalmente incluyen tensioactivos no iónicos (Tweens, Pluronic o polietilenglicol), proteínas inocuas como albúmina sérica, ésteres de sorbitano, ácido oleico, lecitina, aminoácidos tales como glicina, tampones, sales, azúcares o alcoholes de azúcares. Los aerosoles se preparan en general a partir de soluciones isotónicas.

40 Las composiciones farmacéuticas que comprenden complejo de vehículo-péptido/proteína de la presente invención adecuado para administración parenteral comprenden uno o más componentes de un complemento en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido o agentes de suspensión o espesantes.

45 Los ejemplos de excipientes acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

### **Kits**

55 También se desvelan kits para implementar de forma conveniente y eficaz los métodos desvelados en el presente documento. Dichos kits comprenden cualquiera de los complejos de vehículo-péptido/proteína de la presente invención o una combinación de los mismos y un medio para facilitar el cumplimiento de métodos desvelados en el presente documento. Dichos kits, en el caso de formulaciones de complejo de vehículo-péptido/proteína proporcionan un medio conveniente y eficaz para asegurar que el sujeto para tratar tome el activo apropiado en la dosificación correcta de la manera correcta. Los medios de cumplimiento de dichos kits incluyen cualquier medio que facilite la administración de los activos según un método desvelado en el presente documento. Dichos medios de cumplimiento incluyen instrucciones, envases y medios de distribución, y combinaciones de los mismos. Los componentes del kit pueden envasarse para práctica manual o parcial o completamente automática de los métodos anteriores. En otros casos que implican kits, la presente divulgación contempla un kit que incluye composiciones de la presente invención y, opcionalmente, instrucciones para su uso. La muestra puede ser líquidos de muchas fuentes incluyendo suero, plasma, sangre completa, orina, extracto tisular, extractos bacterianos, extractos víricos, extractos fúngicos o cualquier

muestra en la que se sospeche o sea necesario cuantificar la presencia de proteínas básicas (por ejemplo lisostafina).

También se desvela un kit que comprende una composición que comprende: (i) una cadena principal polimérica, (ii) un grupo aniónico de resto de sulfato, sulfonato o fosfato unido covalentemente o enlazado con la cadena principal; (iii) un agente activo con grupos con carga positiva unidos electrostáticamente con el ion de grupo aniónico; y (iii) una cadena protectora unida covalentemente o enlazada con la cadena principal. Los usos para dichos kits incluyen, por ejemplo, aplicaciones terapéuticas. Dichos kits pueden tener una diversidad de usos adicionales, incluyendo, por ejemplo, captura de imágenes, dirección, diagnóstico, terapia, vacunación y similares.

## 10 Ejemplos

La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes Ejemplos. Los Ejemplos se proporcionan solamente para fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance o contenido de la invención de ninguna manera.

15 A menos que se indique otra cosa, todos los números que expresen cantidades de ingredientes, condiciones de reacción y así sucesivamente usados en la memoria descriptiva y reivindicaciones deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener mediante la  
20 presente invención.

Aunque se han mostrado y descrito en el presente documento realizaciones preferidas de la presente invención, resultará evidente para los expertos en la materia que dichas realizaciones se proporcionan solamente como ejemplo. Debería entenderse que pueden emplearse alternativas evidentes a las realizaciones de la invención descritas en el  
25 presente documento en la práctica de la invención.

### **Ejemplos de composiciones con cadenas principales poliméricas procedentes de polisacáridos**

**Ejemplo 1: Síntesis de HPPEG52g:** Se disolvieron 2 g de MPEGAM (PM=5 kDa; 0,4 mmol; Lysan; lote N.º 1 11-102; transparente en solución) en 10 ml de agua y 5 ml de HEPES 1 M pH 7,3 y se añadieron 100 µl de NaOH 10 N para llevar el pH hasta 7,8. El grupo amino se midió mediante TNBS y se descubrió que tenía un total de 0,579 mmol de NH<sub>2</sub> en 2 g. En un recipiente separado, se disolvió 1 g de sal sódica de heparina (25 kDa mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando patrones proteicos globulares, Cat. N.º 41121-1G Acros. Lote N.º B0128763; PM=~593+4sodio-4H=681 Da/disacárido; 1 g de HP tiene 1,47 mmol del grupo carboxilo teórico suponiendo que no hay ninguna sustitución en el carboxilo) en 5 ml de agua (volumen total). El grupo amino se midió mediante TNBS y se descubrió que era un total insignificante de 2,6 µmol por gramo. Esta solución de HP (5 ml) se activó durante 20 minutos añadiendo 80 mg de NHSS (PM=115,14; 0,7 mmol) y 285 mg de EDC (PM=191,71; 1,5 mmol). Este se añadió después a la solución de MPEGAM y se permitió que reaccionara durante 3 horas. Después de 3 horas, el grupo amino se midió y se descubrió que era un total de 192 µmol, lo que indica que se consumió el 67 % de MPEG. El grupo amino se midió de nuevo al día siguiente y se descubrió que era un total de 84 µmol, lo que indica que se consumió el 85 % de PEG. La mezcla de reacción se lavó con 15 cambios de NaCl 1 M y 10 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM 50.000 (UFP-50-E-5A). La muestra HPPEG52g se esterilizó por filtrado (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y se liofilizó produciendo 1,86 gramos. Se analizó un mg/ml y contenía NH<sub>2</sub> 0 +/-5 µM o 0 nmol/mg. Se midieron diez mg/ml para GPC y mostró un tiempo de retención de 14 min (aproximadamente 11,5 nm).

**Ejemplo 2: Síntesis de HPPEG104G:** Se disolvieron 4 g de MPEGAM (PM=10 kDa; 0,4 mmol; Sunbio; lote N.º C1AM-010-05053) en 10 ml de agua y 5 ml de HEPES 1 M pH 7,3 y se añadieron 100 µl de NaOH 10 N para llevar el pH a 7,8. El grupo amino se midió mediante TNBS y se descubrió que era un total de 0,528 mmol de NH<sub>2</sub> en 4 g. Parece haber más grupos amino de lo esperado, quizás MPEGAM tiene menor peso molecular. En un recipiente separado, se disolvió 1 g de sal sódica de Heparina (25 kDa mediante cromatografía de exclusión por tamaño y usando patrones proteicos globulares, Cat. N.º 41121-1G Acros. Lote N.º B0128763; PM=~593+4sodio-4H=681 Da/disacárido; 1 g de HP tiene 1,47 mmol de grupo carboxilo teórico suponiendo que no hay ninguna sustitución en el carboxilo) en 5 ml de agua (volumen total). El grupo amino se midió mediante TNBS y se descubrió que era un total insignificante de 2,2 µmol por gramo. Esta solución de HP (5 ml) se activó durante 20 minutos añadiendo 80 mg de NHSS (PM=115,14; 0,7 mmol) y 285 mg de EDC (PM=191,71; 1,5 mmol). Esto se añadió después a la solución de MPEGAM y se permitió que reaccionara durante 3 horas. Después de 3 horas, el grupo amino se midió y se descubrió que era un total de 152 µmol, lo que indica que se consumió el 71 % de MPEG. El grupo amino se midió de nuevo al día siguiente y se descubrió que era un total de 58 µmol, lo que indica que se consumió el 89 % de PEG. La mezcla de reacción se lavó con 15 cambios de NaCl 1 M y 10 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 50.000 (UFP-50-E-5A). La muestra HPPEG52g se filtró (usando papel de filtro N.º 5 de Fischer) y se liofilizó produciendo 2,05 gramos. Se analizó un mg/ml y contenía NH<sub>2</sub> 0 +/-5 µM o 0 nmol/mg. Se midieron diez mg/ml para GPC y mostró un tiempo de retención de 13,2 min (aproximadamente 17 nm).

**Ejemplo 2: Síntesis de 50CSPEG106G:** Esta composición tiene sulfato de condroitina o CS (originario de tiburón de Fisher Scientific, Pittsburg, PA. Cat N.º 21355, PM=50 kDa) como la cadena principal polimérica con los grupos carboxilo que han reaccionado con 6 gramos de MPEGAM de 10 kDa (PM=10 kDa MPEG con grupo amino en el

extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat N.º P1AM-10)/gramo de CS. Esta composición tiene grupos aniónicos capaces de unirse con péptido/proteínas o moléculas pequeñas con *pI* mayor de 7. Además, los grupos carboxilo restantes pueden modificarse adicionalmente para contener más grupos sulfato, sulfonato o fosfato. Se preparó 50CSPEG106G de la siguiente manera: 6 g de MPEGAM (PM=10 kDa MPEG con grupo amino en el extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat N.º P1AM-10) disuelto en 20 ml de etanol al 80 %, se añadieron 5 ml de HEPES 1 M a la solución y el pH se ajustó a pH 7,8 usando NaOH 10 N. El grupo amino se midió mediante TNBS y se descubrió que era de 0,91 mmol. En un recipiente separado, se disolvió 1 gramo de CS en 8 ml de agua, para obtener una solución de CS y los grupos carboxilo se activaron añadiendo 115 mg de NHS (PM=115,14; 1 mmol), seguido de 575 mg de EDC (PM=191,71; 3 mmol). Después de 20 minutos de activación, este se añadió directamente al MPEGAM. Después de 2 horas, se descubrió que el grupo amino total era de 0,24 mmol lo que indica que se incorporó el 74 % de MPEG. La mezcla de reacción se concentró hasta 100 ml y se lavó con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A). La muestra de 50CSPEG106G se esterilizó por filtrado (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y se liofilizó produciendo 2,4 gramos. Se analizó un mg/ml y contenía NH<sub>2</sub> 4,8 +/-5 µM o 4,8 nmol/mg. Se analizaron diez mg/ml de 50CSPEG106G mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando TosohG4000WXL y mostró un tiempo de retención de 10,7 min (aproximadamente 29,8 nm).

**Ejemplo 4: Síntesis de 50CSPEG106GNTA:** El 50CSPEG106G resultante (véase anteriormente) puede convertirse en 50CSPEG106GNTA y después en 50CSPEG106GNTASO (véase posteriormente). El 50CSPEG106G resultante (véase anteriormente) puede convertirse en 50CSPEG106GNTA de la siguiente manera: Medir los grupos carboxilo restantes de 2,4 gramos de 50CSPEG106G según el protocolo de Kobayashi y Chiba (Analytical biochemistry 1994, vol 219, p189-194). Para sintetizar 50CSPEG106G, tomar 2,4 g de 50CSPEG106G (con 1 equivalente del grupo carboxilo) y disolver en 25 ml de tampón de MES (ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico, Pierce, Rockford, IL) 20 mM a pH 4,7 para obtener solución de 50CSPEG106G. Añadir 1 equivalente de NHS y 2 equivalentes de EDC (PM=191,71) y activar durante 20 minutos. Después de 20 minutos añadir esta solución de 50CSPEG106G activada a 10 equivalentes de Nalfa,Nalfa-biscarboximetil-lisina (PM=262 Da) en 25 ml de tampón de HEPES 1 M a pH 7,4 y permitir que reaccionen durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción hasta 100 ml y lavar con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A). Esterilizar por filtrado el producto de 50CSPEG106GNTA (usando un filtro de polisulfona 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Preparar una solución de 10 mg/ml de 50CSPEG106GNTA resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando Columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato como disolvente de elución (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con el diámetro de aproximadamente 30-40 nm.

**Ejemplo 5: Síntesis de 50CSPEG106GNTASO o 50CSPEG106GNTASF o 50CSPEG106GNTAPO:** Esta estructura comprende sulfato de condroitina 50 kDa con los grupos carboxilo que han reaccionado con 6 gramos de MPEG 10 kDa y los grupos carboxilo restantes unidos covalentemente al grupo amino épsilon de biscarboximetil-lisina que es un derivado de ácido nitrilotriacético (NTA). El NTA se modifica adicionalmente para contener tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato), cada uno unido a los grupos carbonilo de NTA. Esencialmente, cada NTA actúa como un espaciador para permitir que un agrupamiento de tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) se una con la cadena principal de sulfato de condroitina. El 50CSPEG106GNTA (véase anteriormente) puede convertirse en vehículo sulfatado (o sulfonatado o fosforilado) que contiene agrupamientos de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) con hasta tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) en cada agrupamiento. Para hacer esto, tomar 2 gramos de 50CSPEG106GNTA y disolverlos en 50 ml de tampón de MES 10 mM (pH 4,7). Activar el vehículo añadiendo 0,28 g de NHSS (PM=217,14; 1,3 mmol), seguido de 0,56 g de EDC (PM=191,71; 2,9 mmol) y permitir que se activen durante 20 minutos. En un recipiente separado disolver 0,37 g de 2-aminotilhidrogenosulfato (AES; PM=141; 2,6 mmol) o 0,45 g de ácido sulfanílico (SNA; PM=173; 2,6 mmol) o 0,37 g de O-fosforiletanolamina (OPE; PM=141; 2,6 mmol) en 25 ml de tampón de HEPES 1 M (pH 7,3, mantener el pH a 7,3 usando NaOH) y medir los grupos amino de partida mediante TNBS (Spadaro *et al.*, 1979, Anal. Chem., 96, p317-329) que deberían ser aproximadamente 2,6 mmol, dependiendo de la pureza de AES (o SNA u OPE). Añadir el vehículo activado a la solución de AES (o SNA u OPE) y agitar la solución durante una noche. Medir los grupos amino mediante TNBS para determinar la cantidad de reducción de grupos amino que es equivalente a la cantidad de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) incorporados. Lavar el vehículo sulfatado (o sulfonatado o fosforilado) mediante 20 volúmenes de agua usando un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A; GE-Amersham), esterilizar por filtrado (filtro de polisulfona 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar (50CSPEG106GNTASO o 50CSPEG106GNTASF o 50CSPEG106GNTAPO). Este producto tendrá agrupamientos de hasta tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) por agrupamiento que está colgante de la cadena principal.

**Ejemplo 6: Síntesis de 14HPPEG104G:** Esta composición tiene Heparina de 14 kDa ((H4784-1G Sigma. Lote N.º 047K1195; PM 14 kDa; 1 g tiene 0,827 mmol de grupos carboxilo) como la cadena principal polimérica con los grupos carboxilo que han reaccionado con 4 gramos de MPEGAM de 10 kDa (PM=10 kDa MPEG con grupo amino en el extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat. N.º P1AM-10). Esta composición contiene grupos aniónicos capaces de unirse con péptidos/proteínas o moléculas pequeñas con *pI* mayor de 7. Además, los grupos carboxilo restantes pueden modificarse adicionalmente para contener más grupos sulfato, sulfonato o fosfato. El 14HPPEG104G se preparó de la siguiente manera: A) 1 g de sal sódica de Heparina (HP) (H4784-1G Sigma. Lote N.º 047K1 195; 1 g de HP tiene 0,827 mmol de grupo carboxilo) se disolvió en 8 ml de agua (solución de HP). B) En un recipiente

separado, se disolvieron 4 g de MPEG-AM (PM=10000; 0,4 mmol; Sunbio; lote N.º C1AM-010-05053; limpio en solución) en 15 ml de etanol al 80 % y la solución de HP se añadió directamente al MPEG-AM. C) La reacción se compuso hasta MES 20 mM pH=4,7 con adición de agua para eliminar el precipitado. La reacción se inició mediante la adición de 80 mg de NHS (PM=115,14; 0,7 mmol) y 380 mg de EDC (PM=191,71; 2 mmol) y se agitó durante 20 minutos. Después de 20 minutos, se añadieron 4 ml de HEPES 1 M a la solución y el pH se ajustó hasta pH 7,8 lentamente con NaOH 10 N gota a gota, y se permitió que reaccionara durante una noche. Se tomaron alícuotas para determinar los grupos amino restantes del MPEG-AM y determinar el MPEG incorporado. El grupo amino se encontró hasta un total de 0,011 mmol lo que indica que se incorporó todo el MPEG (14HPPEG104G). D) La mezcla de reacción se concentró hasta 100 ml y se lavó con 20 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100.000 (UFP-100-E-5A), se esterilizó por filtrado (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y se liofilizó produciendo 2,4 gramos. Se analizó un mg/ml y contenía NH<sub>2</sub> +/-5 µM o 0 nmol/mg. E) La cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) eluida con solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contenía acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min mostró un tiempo de retención de 12,7 min (aproximadamente 13,8 nm).

**Ejemplo 7: Síntesis de 14HPPEG104GNTA:** El 14HPPEG104G resultante (véase anteriormente) puede convertirse en 14HPPEG104GNTA y después en 14HPPEG104GNTASO, 14HPPEG104GNTASF o 14HPPEG104GNTAPO (véase posteriormente). El 14HPPEG104G resultante (véase anteriormente) puede convertirse en 14HPPEG104GNTA de la siguiente manera: Medir los grupos carboxilo restantes de 2,4 gramos de 14HPPEG104G según el protocolo de Kobayashi y Chiba (Analytical biochemistry 1994, vol 219, p189-194). Para sintetizar 14HPPEG104GNTA, tomar 2,4 g de grupo carboxilo de 14HPPEG104G) y disolver en 25 ml de tampón de MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, Pierce, Rockford, IL) 20 mM a pH 4,7 para obtener solución de 14HPPEG104G. Añadir 1 equivalente de NHS y 2 equivalentes de EDC (PM=191,71) y activar durante 20 minutos. Después de 20 minutos añadir esta solución de 14HPPEG104G activada a 10 equivalentes de Nalfa,Nalfa-biscarboximetil-lisina (PM=262 Da) en hasta 25 ml de tampón de HEPES 1 M a pH 7,4 y permitir que reaccionen durante una noche. Medir los grupos amino restantes para determinar el grado de incorporación de NTA. Concentrar la mezcla de reacción hasta 100 ml y lavar con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A). Esterilizar por filtrado el producto de 14HPPEG104GNTA (usando un filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Preparar una solución de 10 mg/ml de 14HPPEG104GNTA resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato como disolvente de elución (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con el diámetro de aproximadamente 15-20 nm.

**Ejemplo 8: Síntesis de 14HPPEG104GNTASO o 14HPPEG104GNTASF o 14HPPEG104GNTAPO:** Esta estructura comprende heparina 14 kDa en la que el 27 % de los grupos carboxilo teóricos están unidos covalentemente con MPEG de 10 kDa y los grupos carboxilo restantes están unidos covalentemente con el grupo amino épsilon de biscarboximetil-lisina que es un derivado de ácido nitrilotriacético (NTA): El NTA se modifica adicionalmente para contener tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato), cada uno unido a los grupos carbonilo de NTA. Esencialmente, cada NTA actúa como un espaciador para permitir que un agrupamiento de tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) se una con la cadena principal de heparina (también pueden usarse otras cadenas principales). Para hacer esto, tomar 2 gramos del 14HPPEG104GNTA y disolverlo en 50 ml de tampón de MES 10 mM (pH 4,7). Activar el vehículo añadiendo 0,28 g de NHSS (PM=217,14; 1,3 mmol), seguido de 0,56 g de EDC (PM=191,71; 2,9 mmol) y permitir que se active durante 20 minutos. En un recipiente separado disolver 0,37 g de 2-aminoetilhidrogenosulfato (AES; PM=141; 2,6 mmol) o 0,45 g de ácido sulfanílico (SNA; PM=173; 2,6 mmol) o 0,37 g de O-fosforiletanolamina (OPE; PM=141; 2,6 mmol) en 25 ml de tampón HEPES 1 M (pH 7,3, mantener el pH a 7,3 usando NaOH) y medir los grupos amino de partida mediante TNBS (Spadaro *et al.*, 1979, Anal. Chem., 96, p317-329) que deberían ser aproximadamente 2,6 mmol, dependiendo de la pureza de AES (o SNA u OPE). Después de 20 minutos, añadir el vehículo activado a la solución de AES (o SNA u OPE). Después de una reacción de una noche medir los grupos amino mediante TNBS para determinar la cantidad de reducción de grupos amino que es equivalente a la cantidad de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) incorporados. Lavar el vehículo sulfatado (o sulfonatado o fosforilado) mediante 20 volúmenes de agua usando un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A; GE-Amersham), esterilizar por filtrado (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar (14HPPEG104GNTASO o 14HPPEG104GNTASF o 14HPPEG104GNTAPO). Este producto tendrá agrupamientos de hasta tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) por agrupamiento colgante de la cadena principal.

**Ejemplo 9: Síntesis de 1000HYPEG1035NTA:** Este se usará como materiales de partida para la síntesis de algunas de las composiciones de núcleo aniónico de la presente invención. Esta composición tiene ácido hialurónico o HY (Sigma Chem. Co. St Luis Mo. Cat. N.º 53747, PM=1000 kDa) como la cadena principal polimérica con el 35 % de los grupos carboxilo teóricos reemplazados con MPEGAM de 10 kDa (PM=10 kDa MPEG con grupo amino en el extremo: Sunbio, Orinda, CA; Cat. N.º P1AM-10) y los grupos carboxilo restantes ocupados con ácido nitrilotriacético. Para hacer esto el ácido hialurónico puede usarse sin adición de más grupos carboxilo o pueden añadirse grupos carboxilo adicionales. Para añadir grupos carboxilo adicionales, los grupos hidroxilo en el hialuronano pueden convertirse en grupos carboxi según el protocolo de Tijssen *et al.* (Carbohydrate Polymers 2001, vol 45; p219-226). Al final del protocolo de Tijssen *et al.* el hialuronano carboximetilado se lava con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 3 kDa (UFP-3-E-5A). Esterilizar por filtrado el producto



resultante usando (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar para obtener hiluronano con grupos carboxilo extra. Antes de la síntesis de 1000HYPEG1035NTA, medir el grupo carboxilo de partida (1 equivalente) de 1,0 g de HY (este podría ser HY sin grupos carboxilo adicionales o el modificado para tener grupos carboxilo adicionales) según el protocolo de Kobayashi y Chiba (Analytical biochemistry 1994, vol 219, p189-194).

5 Para sintetizar 1000HYPEG1035NTA, tomar 1,0 g de HY (con 1 equivalente de grupo carboxilo) y disolver en 25 ml de tampón de MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, Pierce, Rockford, IL) 20 mM a pH 4,7 para obtener solución de HY. Disolver 0,35 equivalentes de MPEGAM (PM=10 kDa MPEG con grupo amino en el extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat. N.º P1AM-10) en 20 ml de etanol al 80 % y añadir a la solución de HY para preparar la solución HYPEG. A la solución de HYPEG, añadir 1 equivalente de NHS (PM=115,14) y 1 equivalente de solución de EDC (PM=191,71) con agitación. Mantener el pH a pH 4,7-5,0 con HCl 6 N durante 20 minutos usando HCl.

10 Después de 20 minutos de activación, ajustar el pH a 7,8 añadiendo 10 ml de HEPES 1 M, pH 7,4, y ajustar adicionalmente el pH con NaOH 10 N gota a gota hasta alcanzar 7,8. Permitir que la reacción continúe durante 2 horas y medir el grupo amino restante del MPEGAM mediante TNBS y no debería haber ninguno lo que indica que se han consumido los 0,35 equivalentes del grupo amino y se han conjugado con el HY. Si hay grupos amino

15 restantes añadir 1 equivalente de EDC (PM=191,71) y permitir que reaccione durante una noche para formar 1000HYPEG1035. Tomar una alícuota de la solución de 1000HYPEG1035 resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene acetonitrilo al 15 % como disolvente de elución a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con un diámetro de aproximadamente 30-50 nm. Ajustar el pH a 5 con HCl 6 N y añadir 1,5 equivalentes de EDC (PM=191,71) y activar durante 20 minutos. Después de 20 minutos añadir esta solución de 1000HYPEG1035 activada a 10 equivalentes de Nalfa,Nalfa-biscarboximetil-lisina (PM=262 Da) en hasta 25 ml de tampón de HEPES 1 M a pH 7,4 y permitir que reaccionen durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción hasta 100 ml y lavar con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A). Esterilizar por filtrado el producto de 1000HYPEG1035NTA (usando filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Preparar una solución de 10 mg/ml de 1000HYPEG1035NTA resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato como disolvente de elución (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con un diámetro de aproximadamente 30-70 nm.

**Ejemplo 10: Síntesis de 1000HYPEG1035NTASO o 1000HYPEG1035NTASF o 1000HYPEG1035NTAPO:** Esta estructura comprende ácido hialurónico de 100 kDa en el que el 35 % de los grupos carboxilo teóricos están unidos covalentemente con MPED de 10 kDa y los grupos carboxilo restantes están unidos covalentemente al grupo amino épsilon de biscarboximetil-lisina que es un derivado de ácido nitrilotriacético (NTA). El NTA se modifica

35 adicionalmente para contener tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato), cada uno unido con los grupos carbonilo de NTA. Esencialmente, cada NTA actúa como un espaciador para permitir que un agrupamiento de tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) se una con la cadena principal de ácido hialurónico (también pueden usarse otras cadenas principales). El 1000HYPEG1035NTA (véase anteriormente) puede convertirse para contener sulfato (o sulfonato o fosfato) con hasta tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) en cada agrupamiento. Para hacer esto,

40 tomar 2 gramos del 1000HYPEG1035NTA y disolverlos en 50 ml de tampón de MES 10 mM (pH 4,7). Activar el vehículo añadiendo 0,28 g de NHSS (PM=217,14; 1,3 mmol), seguido de 0,56 g de EDC (PM=191,71; 2,9 mmol), y permitir que se active durante 20 minutos. En un recipiente separado disolver 0,37 g de 2-aminoetilhidrogenosulfato (AES; PM=141; 2,6 mmol) o 0,45 g de ácido sulfanílico (SNA; PM=173; 2,6 mmol) o 0,37 g de O-fosforiletanolamina (OPE; PM=141; 2,6 mmol) en 25 ml de tampón de HEPES 1 M (pH 7,3, mantener el pH a 7,3 usando NaOH) y medir los grupos amino de partida mediante TNBS (Spadaro *et al.*, 1979, Anal. Chem., 96, p317-329) que debería ser de aproximadamente 2,6 mmol, dependiendo de la pureza de AES (o SNA u OPE). Después de 20 minutos, añadir el vehículo activado a la solución de AES (o SNA u OPE). Después de una reacción de una noche medir los grupos amino mediante TNBS para determinar la cantidad de reducción de grupos amino que es equivalente a la cantidad de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) incorporados. Lavar el vehículo sulfatado (o sulfonatado o fosforilado) mediante 20 volúmenes de agua usando un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A; GE-Amersham), esterilizar por filtrado (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar (1000HYPEG1035NTASO o 1000HYPEG1035NTASF o 1000HYPEG1035NTAPO). Este producto tendrá agrupamientos de hasta tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) por agrupamiento que está colgante de la cadena principal.

**Ejemplo 11: Síntesis de 60PGAPEG1035NTA:** Este se usará como materiales de partida para la síntesis de algunas de las composiciones de núcleo aniónico de la presente invención. Esta composición tiene pectina o ácido poligalacturónico (polipectato sódico; Sigma Chem. Co. St Luis Mo. Cat. N.º p3889, PM=60 kDa) como la cadena principal polimérica con el 35 % de los grupos carboxilo teóricos reemplazados con MPEGAM de 10 kDa (PM=10 kDa MPEGAM tiene un grupo amino en el extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat. N.º P1AM-10) y los grupos carboxilo restantes ocupados con ácido nitrilotriacético. La modificación de 60PGAPEG1035NTA a 60PGAPEG1035NTASO, 60PGAPEG1035NTASF y 60PGAPEG1035NTAPO; donde SO, SF y PO son sulfato, sulfonato y fosfato unidos covalentemente con los grupos carbonilo de NTA; es como se ha descrito anteriormente para otras composiciones que contienen NTA. Para preparar 60PGAPEG1035NTA, puede usarse la pectina de partida sin adición de más grupos carboxilo o pueden añadirse grupos carboxilo adicionales. Para añadir grupos

65 carboxilo adicionales, los grupos hidroxilo en hiluronano pueden convertirse en grupos carboxilo según el protocolo de Tijssen *et al.* (Carbohydrate Polymers 2001, vol 45; p219-226). Al final del protocolo de Tijssen *et al.* la pectina

carboximetilada se lava con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 3 kDa (UFP-3-E-5A). Esterilizar por filtrado el producto resultante (PMA) usando (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar para obtener pectina con grupos carboxilo extra. Ocasionalmente, la pectina tendrá un porcentaje significativo del grupo carboxilo bloqueado con grupos metilo. Este puede retirarse usando ácido para exponer todos los grupos carboxilo de pectina. En resumen, disolver 2 g de pectina en 100 de agua y ajustar el pH a 0,5 usando HCl concentrado y mantener a 80 °C durante 2 horas según Constenla y Lazano (Latin American Applied Research 2003, vol33, p91-96). Neutralizar con NaOH y lavar con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 3 kDa (UFP-3-E-5A). Esterilizar por filtrado el producto resultante usando (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Esta pectina puede procesarse para aumentar la cantidad de grupos carboxilo como se ha descrito anteriormente. Puede prepararse 60PGAPEG1035NTA usando cualquiera de la pectina (PGA) descrita anteriormente, sin procesar o procesada para aumentar el grupo carboxilo. Antes de la síntesis de 60PGAPEG1035NTA, medir el grupo carboxilo de partida (1 equivalente) de 1,0 g de PGA (este podría ser PGA sin grupos carboxilo adicionales o PGA modificado para tener grupos carboxilo adicionales) según el protocolo de Kobayashi y Chiba (Analytical biochemistry 1994, vol 219, p189-194). Para sintetizar 60PGAPEG1035NTA, tomar 1,0 g de PGA (con 1 equivalente de grupo carboxilo) y disolver en 50 ml de tampón de MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, Pierce, Rockford, IL) 20 mM a pH 4,7 para obtener solución de PGA. Disolver 0,35 equivalentes de MPEGAM (PM=10 kDa MPEG con grupo amino en el extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat. N.º P1AM-10) en 20 ml de etanol al 80 % y añadir a la solución de PGA para preparar la solución de PGAPEG. A la solución de PGAPEG, añadir 1 equivalente de NHS (PM=115,14) y 1 equivalente de solución de EDC (PM=191,71) con agitación. Mantener el pH a pH 4,7-5,0, con HCl 6 N durante 20 minutos usando HCl. Después de 20 minutos de activación, ajustar el pH a 7,8 añadiendo 10 ml de HEPES 1 M, pH 7,4 y ajustar el pH a 7,8 con NaOH 10 N gota a gota. Permitir que la reacción continúe durante 2 horas y medir el grupo amino restante del MPEGAM mediante TNBS y no debería haber ninguno lo que indica que se han consumido los 0,35 equivalentes del grupo amino y se han conjugado con el PGA. Si hay grupos amino restantes en MPEGAM, ajustar el pH a 5 con HCl 6 N y añadir 1 equivalente de EDC (PM=191,71), después de 20 minutos ajustar de nuevo el pH a 7,8 y permitir que reaccione durante una noche para formar 60PGAPEG1035. Tomar una alícuota de la solución de 60PGAPEG1035 resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene acetonitrilo al 15 % como disolvente de elución a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con un diámetro de aproximadamente 18-30 nm. Ajustar el pH a 5 con HCl 6 N y añadir 1,5 equivalentes de EDC (PM=191,71) y activar durante 20 minutos. Después de 20 minutos añadir esta solución de 60PGAPEG1035 activada a 10 equivalentes de Nalfa,Nalfa-biscarboximetilisina (PM=262 Da) en hasta 25 ml de tampón de HEPES 1 M a pH 7,4 y permitir que reaccione durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción hasta 100 ml y lavar con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A). Esterilizar por filtrado el producto de 60PGAPEG1035NTA (usando filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Preparar una solución de 10 mg/ml de 60PGAPEG1035NTA resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato como disolvente de elución (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con un diámetro de aproximadamente 20-40 nm.

**Ejemplo 12: Síntesis de 30CHIPEG1035DTPA:** Este se usará como materiales de partida para la síntesis de algunas de las composiciones de núcleo aniónico de la presente invención. La presente composición tiene quitosano (Sigma Chem. Co. St Luis Mo. Cat. N.º 448869, PM=35 kDa) como la cadena principal polimérica con el 35 % de los grupos amino teóricos ocupados con MPEGC de 10 kDa (PM=10 kDa; MetoxiPEG con grupo carboxilo en el extremo, de Lysan bio; Arab, AL) y el grupo amino restante ocupado con ácido dietilendiaminopentaacético (DTPA). La modificación de 30CHIPEG1035DTPA a 30CHIPEG1035DTPASO, 30CHIPEG1035DTPASF y 30CHIPEG1035DTPAPO; donde SO, SF y PO son sulfato, sulfonato y fosfato unidos covalentemente con los grupos carbonilo de DTPA; es como se ha descrito anteriormente para otra composición que contiene carboxilo. Para sintetizar 30CHIPEG1035DTPA, tomar 1,0 g de clorhidrato de quitosano (con 1 equivalente de grupo amino como se mide mediante TNBS) y disolver en 25 ml de tampón de HEPES 1 M a pH 7,4 (Pierce, Rockford, IL) para obtener una solución de 30CHI. En un recipiente separado, disolver 0,35 equivalentes de MPEGC (PM=10 kDa; MetoxiPEG con grupo carboxilo en el extremo, de Lysan bio; Arab, AL) en 60 ml de etanol al 80 % con MES 20 mM pH=4,7 (1200 µl de MES 1 M añadido a 60 ml), añadir 0,5 equivalentes de NHS (PM=115,14), una vez disuelto añadir 1 equivalente de EDC (PM=191,71; 10,43 mmol) agitando al mismo tiempo y permitir que continúe la activación durante 20 minutos. Añadir MPEGC activado directamente a la solución de 30CHI, permitir que la reacción se produzca durante 2 horas y medir los grupos amino mediante TNBS para asegurar si la saturación del 35 % de grupos amino añade más de la cantidad apropiada de MPEGC activado. Esta es la solución de 30CHIPEG1035. Realizar cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) con solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene elución de acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con aproximadamente 14-17 nm de diámetro molecular. Añadir 5 equivalentes de dianhídrido de DTPA (PM=357; Sigma Chem Co., St Louis, MO. Cat. N.º D6148) seguido de 200 µl de TEA. Valorar la reacción lentamente con NaOH 10 N hasta pH 7,1 y agitar durante 4 horas. Usando reacción de TNBS, confirmar que no permanece ningún grupo amino lo que es indicativo de una reacción completa y que se prepara el producto de 30CHIPEG1035DTPA. Realizar cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) con solución

salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene elución de acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con un diámetro molecular de 17-21 nm. Lavar el 30CHIPEG1035DTPA resultante con 15 volúmenes de agua usando un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100.000 (UFP-100-E-5A; GE-Amersham) y liofilizar.

5 **Ejemplo 13: Síntesis de 40DXPEG1035NTA:** Este se usará como materiales de partida para la síntesis de algunas de las composiciones de núcleo aniónico de la presente invención. Esta composición tiene dextrano o poliglucosa (alfa1-6 con rama alfa1-4; Sigma Chem. Co. St Luis Mo. Cat. N.º 31389, PM=40 kDa) como la cadena principal polimérica con el 35 % de los grupos hidroxilo derivatizados con MPEGAM de 10 kDa (PM=10 kDa MPEGAM tiene un grupo amino en el extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat. N.º P1AM-10) y en los grupos hidroxilo  
10 restantes ocupados con ácido nitrilotriacético. La modificación de 40DXPEG1035NTA a 40DXPEG1035NTASO, 40DXPEG1035NTASF y 40DXPEG1035NTAPO; donde SO, SF y PO son sulfato, sulfonato y fosfato unidos covalentemente con los grupos carbonilo de NTA; es como se ha descrito anteriormente para otras composiciones que contienen carboxilo. Para preparar 40DXPEG1035NTA, los grupos hidroxilo de dextrano de partida se convierten en grupos carboxilo. Para añadir grupos carboxilo, los grupos hidroxilo en dextrano pueden convertirse  
15 en grupos carboxilo según el protocolo de Tijsen *et al.* (Carbohydrate Polymers 2001, vol 45; p219-226). En resumen, suspender 10 gramos de dextrano en 100 ml de propanol/agua al 90 % y añadir 4 gramos de sedimento de NaOH y agitar durante una noche a 40 °C. Al día siguiente añadir 10 gramos de monocloroacetato sódico (Sigma Chem Co. St Luis, MO. Cat. N.º 291773) como se perfila en Tijsen *et al.* (Carbohydrate Polymers 2001, vol 45; p219-226). Al final de la reacción el dextrano carboximetilado se lava con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 3 kDa (UFP-3-E-5A). Esterilizar por filtrado el producto resultante (DX) usando (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar para obtener dextrano carboximetilado. Antes de la síntesis de 40DXPEG1035NTA, medir el grupo carboxilo de partida (1 equivalente) de 1,0 g de DX según el protocolo de Kobayashi y Chiba (Analytical biochemistry 1994, vol 219, p189-194). Para sintetizar 40DXPEG1035NTA, tomar 1,0 g de DX (con 1 equivalente de grupos carboxilo) y disolver en 50 ml de tampón de  
20 MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, Pierce, Rockford, IL) 20 mM a pH 4,7 para obtener una solución de DX. Disolver 0,35 equivalentes de MPEGAM (PM=10 kDa MPEG con grupo amino en el extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat. N.º P1AM-10) en 20 ml de etanol al 80 % y añadir a la solución de DX para preparar solución de DXPEG. A la solución de DXPEG, añadir 1 equivalente de NHS (PM=115,14) y 1 equivalente de solución de EDC (PM=191,71) con agitación. Mantener el pH a pH 4,7-5,0, con HCl 6 N durante 20 minutos usando HCl. Después de 20 minutos de activación, ajustar el pH a 7,1 añadiendo 10 ml de HEPES 1 M, pH 7,4. Si el pH es inferior a 7,1 ajustar el pH con NaOH 10 N gota a gota hasta alcanzar 7,1. Permitir que la reacción continúe durante 2 horas y medir el grupo amino restante del MPEGAM mediante TNBS y no debería ser ninguno lo que indica que se han consumido los 0,35 equivalentes del grupo amino y se han conjugado con el PGA. Si hubiera grupos amino restantes en MPEGAM, ajustar el pH a 5 con HCl 6 N y añadir 1 equivalente de EDC (PM=191,71), después de 20 minutos  
30 ajustar de nuevo el pH a 7,1 y permitir que reaccione durante una noche para formar 40DXPEG1035. Tomar una alícuota de la solución de 40DXPEG1035 resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene acetonitrilo al 15 % como disolvente de elución a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con un diámetro de aproximadamente 14-20. Ajustar el pH a 5 con HCl 6 N y añadir 1,5 equivalentes de EDC (PM=191,71) y activar durante 20 minutos. Después de 20 minutos añadir esta solución de 40DXPEG1035 activada a 10 equivalentes de Nalfa,Nalfa-biscarboximetil-lisina (PM=262 Da) en hasta 25 ml de tampón de HEPES 1 M a pH 7,4 y permitir que reaccionen durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción que contiene 40DXPEG1035NTA hasta 100 ml y lavar con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A). Esterilizar por filtrado el producto de 40DXPEG1035NTA (usando filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Preparar una solución de 10 mg/ml de 40DXPEG1035NTA resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y elución a un caudal de 0,6 ml/min con solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene acetonitrilo al 15 %. El tiempo de retención debería ser  
40 coherente con un diámetro de aproximadamente 17-25 nm.

#### **Ejemplos de composiciones con cadenas principales poliméricas procedentes de poliaminoácidos**

55 **Ejemplo 14: Síntesis de 20PLPEG1030DTPASO o 20PLPEG1030DTPASF o 20PLPEG1030DTPAPO:** Esta estructura comprende polilisina de 20 kDa en la que el 30 % de los grupos amino épsilon están unidos covalentemente con MPEG de 10 kDa y los grupos amino restantes están unidos covalentemente con ácido dietilentiáminopentaacético (DTPA) modificado para contener grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) unidos covalentemente con los grupos carbonilo de DTPA. Esencialmente, cada DTPA actúa como un espaciador para permitir que un agrupamiento de cuatro grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) se unan con la cadena principal de polilisina (también pueden usarse otras cadenas principales). Esta se sintetizó de la siguiente manera: A) se disolvió 1 g de polilisina de 20 kDa (20PL; producto N.º Q4926 de SAFC lote N.º 018K7775; DP=126) en 6,5 ml de HEPES 1 M. El grupo amino se midió mediante TNBS y se descubrió que era 2,4 mmol de NH<sub>2</sub>/g. Esta es la solución de 20PL. B) En un recipiente separado, se disolvieron 5 g de MPEGC (Metoxipoliétilen glicolcarboximetilo; PM=10 kDa; 0,5 mmol; Laysan Bio; lote N.º 108-108) en 12,5 ml de etanol al 80 % con tampón MES de 10 mM, pH=4,7, con 120 mg de NHS (PM=115,14; 1,0 mmol). Una vez disuelto se añadieron 320 g de EDC (PM=191,71; 1,7 mmol) con agitación. Se permitió que la activación continuara durante 20 minutos. El MPEGC activado se  
60 65

añadió a la solución de 20PL. El pH se ajustó a pH 7,8 lentamente con NaOH 10 N gota a gota y se permitió que reaccionara durante una noche. Se tomaron alícuotas para medición de grupos amino usando TNBS y se descubrió que eran 1,60 mmol lo que indica saturación de PEG del 33,5 %. Esta es la solución de 20PLPEG1030DA. C) Cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) eluida con solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min mostró un tiempo de retención de 11,3 min (aproximadamente 23,9 nm de diámetro). D) Se añadieron 3,5 g de DTPA (dianhídrido de ácido dietilentriaminopentaacético; PM=257,32; 9,8 mmol; 6 equivalentes molares de grupo amino) a la solución en la etapa B (20PLPEG1030DA; 1,6 mmol de NH<sub>2</sub>) y seguido de 100 µl de TEA (trietilamina). La mezcla se valoró lentamente hasta pH 7,8 con NaOH 10 N y se permitió que reaccionara durante una noche. Los grupos amino se midieron y se descubrió que eran 0 µM. La mezcla de reacción se diluyó con 50 ml de etanol al 50 % y se lavó con 10 cambios de agua en cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100.000 (UFP-100-E-5A). La solución se concentró hasta 100 ml en agua. E) Se disolvieron 12,7 mmol de hidrogenosulfato de 2-aminoetilo (AES; C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>N-SO<sub>4</sub>; PM=141,14; 12,7 mmol; Acros; Cas N.º 926-39-6; lote N.º A004514401) o ácido sulfanílico (SNA, C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N-SO<sub>3</sub>; PM=173,19; 12,7 mmol; Acros; Cas N.º 121-57-3; lote N.º A018717701) u O-fosforiletanolamina (C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>N-PO<sub>4</sub>; PM=141,06; 12,7 mmol; Acros; Cas N.º 1071-23-4; lote N.º 0001437763) en 25 ml de HEPES 1 M. La mezcla se valoró lentamente hasta pH 7,8 con NaOH 10 N. El grupo amino se midió mediante TNBS y se descubrió que era de aproximadamente 16 mmol de NH<sub>2</sub>. F) Se compuso la solución de la etapa D (20PLPEG1030DTPA; 4 x 1,6 = 6,4 mmol de carboxilo) hasta MES 10 mM pH=4,7 (1100 µl de MES 1 M añadido a 110 ml) y se añadieron 880 mg de NHS (PM=115,14; 7,7 mmol). Una vez disuelto, se inició la activación añadiendo 4 g de EDC (PM=191,71; 21 mmol) y se permitió que continuara durante 20 minutos. El vehículo activado se añadió a la solución E que se permitió que reaccionara durante una noche. Se tomaron alícuotas para análisis de grupos amino mediante TNBS y se descubrió que eran aproximadamente 9 mmol y lo que indica DTPA completamente saturado con sulfato (o sulfonato o fosfato). Esta es la solución de 20PLPEG1030DTPASO o 20PLPEG1030DTPASF o 20PLPEG1030DTPAPO. F) La solución se lavó con 10 cambios de agua usando cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A de GE) y se concentró adicionalmente hasta 100 ml. G) La muestra se esterilizó por filtrado (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y se liofilizó produciendo ~4 gramos.

**Ejemplo 15: Síntesis de 40PLPEG535DTPA y 40PLPEG535DTPAIDA:** Esta se usará como materiales de partida para la síntesis de algunas de las composiciones de núcleo aniónico de la presente invención. Para preparar esta, se disolvieron 1,0 g de 40PL (P3995 Sigma lote N.º 085K5102) en 50 ml de HEPES 200 mM. Se midieron grupos amino mediante ensayo de TNBS y se descubrió que eran de 2,86 mmol de NH<sub>2</sub>/g. Se activaron tres gramos de MPEGC (MetoxiPoliEtilenGlicol-CarboxiMetilo; 1 mmol; PM=5 kDa; 9,0 mmol; Laysan Bio; lote N.º 108-41; transparente en solución) en 17,5 ml de MES 10 mM pH=4,7 añadiendo 150 mg de NHSS (PM=217,14; 0,7 mmol), seguido de 300 mg de EDC (PM=191,71; 1,57 mmol). Se permitió que la activación continuara durante 20 minutos. El volumen total de solución de MPEGC en esta etapa fue de 18 ml. El MPEGC activado se añadió a una solución de 40PL y se permitió que reaccionara. Después de 45 minutos, se activaron 3 g adicionales de MPEGC y se añadieron como anteriormente y se permitió que reaccionaran durante 2 horas. Se midieron grupos amino mediante TNBS y se descubrió que eran 103 µM lo que proporciona una saturación del 28 %. La cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) eluida con solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min mostró un tiempo de retención de 11,72 min en UV o 12,20 min en RI (18,4 nm). Se activaron otros 1,5 g y se añadieron hasta alcanzar una saturación de grupos amino del 35 % basándose en los grupos amino restantes medidos (91 µM en 94 ml o 1,82 mmol en total) mediante TNBS. Después de la adición de 1,5 g de MPEG el tiempo de retención en UV se convierte en 11,60 min o 12,10 min en RI o 19 nm. Se añadieron cuatro gramos de DTPA-dianhídrido y el pH se ajustó continuamente para mantener el pH entre 7 y 8. Después de 4 horas, el grupo amino total se midió mediante TNBS y se descubrió que era 0,0 µM. La mezcla de reacción que contenía 40PLPEG535DTPA se lavó con 20 volúmenes de agua usando cartucho de ultrafiltración con punto de corte de peso molecular (PCPM) de 100 kDa (UFP-100-E-5A; GE Healthcare) y se liofilizó, proporcionando 4,7 g (40PLPEG535DTPA). La mitad (2,35 g) se saturó con ácido iminodiacético (IDA) de la siguiente manera: se compuso IDA (3 g) hasta 10 ml de HEPES 1 M, el pH se ajustó a 7,5 y se compuso hasta 50 ml en HEPES 1 M. La mitad de 40PLPEG535DTPA se dividió en 3 partes iguales (1,3 mmol de carboxilo cada una basándose en la estequiometría) y cada una (25 ml) llevada hasta pH 4,7 con 200 µl de MES 1 M, pH 4,7, el pH no descendió hasta 4,7 y por lo tanto se añadieron 20 µl de HCl 6 N. Este se activó mediante la adición de 2 mmol de NHSS (434 mg) y 4,5 mmol de EDC (864 mg). Después de 20 minutos, el 40PLPEG535DTPA activado se añadió a IDA anterior y se repitió 2 veces más y se agitó durante 2 horas. El producto (40PLPEG535DTPAIDA) se lavó con 20 volúmenes de agua, se esterilizó por filtrado (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y se liofilizó proporcionando 2,0 g (40PLPEG535DTPAIDA).

**Ejemplo 16. Síntesis de 40PLPEG535DTPASO o 40PLPEG535DTPASF o 40PLPEG535DTPAPO o 40PLPEG535DTPAIDASO o 40PLPEG535DTPAIDASF o 40PLPEG535DTPAIDAPO:** Esta estructura comprende polilisina de 40 kDa en la que el 35 % de los grupos amino épsilon están unidos covalentemente con MPEG de 5 kDa y los grupos amino restantes están unidos covalentemente con ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) modificado para contener grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) unidos covalentemente con los grupos carbonilo de DTPA. Esencialmente, cada DTPA actúa como un espaciador para permitir que un agrupamiento de cuatro grupos sulfato se unan a la cadena principal de polilisina (también pueden usarse otras cadenas principales). El 40PLPEG535DTPA o 40PLPEG535DTPAIDA puede convertirse en vehículo sulfatado (o sulfonatado o fosforilado) que contiene hasta varios grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) en cada agrupamiento. Para hacer

esto, tomar 2 gramos de 40PLPEG535DTPA o 1 gramo de 40PLPEG535DTPAIDA y disolverlo en 50 ml de tampón de MES 10 mM (pH 4,7). Activar el vehículo añadiendo 0,37 g de NHSS (PM=217,14; 1,7 mmol), seguido de 0,75 g de EDC (PM=191,71; 3,9 mmol) y permitir que se activen durante 20 minutos. En un recipiente separado disolver 0,5 g de 2-aminoetilhidrogenosulfato (AES; PM=141; 3,5 mmol) o 0,6 g de ácido sulfanílico (SNA; PM=173; 3,5 mmol) o 0,5 g de O-fosforiletanolamina (OPE; PM=141; 3,5 mmol) en 25 ml de tampón de HEPES 1 M (pH 7,3, ajustar el pH a 7,8 usando NaOH) y medir los grupos amino de partida mediante TNBS (Spadaro *et al.*, 1979, Anal. Chem., 96, p317-329) que deberían ser aproximadamente 3,5 mmol. Añadir vehículo activado a solución de AES (o SNA u OPE). Después de 2 horas añadir otros 0,75 g de EDC y agitar la solución durante una noche. Medir los grupos amino mediante TNBS para determinar la cantidad de reducción de grupos amino que es equivalente a la cantidad de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) incorporados. Lavar el vehículo sulfatado (o sulfonatado o fosforilado) mediante 20 volúmenes de agua usando un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A; GE-Amersham), esterilizar por filtrado (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Este producto (40PLPEG535DTPASO o 40PLPEG535DTPASF o 40PLPEG535DTPAPO o 40PLPEG535DTPAIDASO o 40PLPEG535DTPAIDASF o 40PLPEG535DTPAIDAPO) tendrá un agrupamiento de hasta 4-8 grupos sulfato, sulfonato o fosfato colgantes de la cadena principal.

**Ejemplo 17: Síntesis de 40PLPEG537NDA de NTA unido a grupo amino de polilisina (lote N.º 20080124b):**

El 40PLPEG537NDA se usará como el material de partida para la síntesis de algunas de las composiciones de núcleo aniónico de la presente invención. Esta estructura comprende polilisina de 40 kDa en la que el 37 % de los grupos amino están unidos covalentemente con MPEG de 5 kDa y los grupos amino restantes están unidos covalentemente con uno de los grupos carbonilo de ácido nitrilotriacético (NTA). Para hacer esto, se disolvieron 1,0 gramos de 40PL (Sigma P3995 lote número 127K5101; 1 g contiene 2,62 mmol de NH<sub>2</sub>) en 50 ml de HEPES 400 mM. Se activaron cinco g de MPEGC (1 mmol; PW=5 kDa; Sigma/Fisher/Fluka; Cat. N.º 70718; lote N.º 64748/1) en 20 ml de MES 10 mM pH=4,7 añadiendo 250 mg de NHS (PM=115,09; 2 mmol), seguido de 500 mg de EDC (PM=191,71; 1,8 mmol). Se permite que la activación continúe durante 20 minutos (el volumen total es de 20 ml). El MPEGC activado se añadió a una solución de 40PL (pH 7,45 antes de la adición). Se permitió que la mezcla reaccionara durante 4 horas. La medición del grupo amino antes (2,62 mmol) y después (1,64 mmol) de la adición de MPEGC indicó que la saturación de PEG del grupo amino fue de 37 %. La cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) eluida con solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min mostró un tiempo de retención de 12,5 min (o aproximadamente 16 nm de diámetro). Esta es la solución de 40PLPEG537DA. En un recipiente separado, se neutralizó NTA (PM=191; 1 g o 5,2 mmol) en agua con 1 ml de NaOH y se tamponó con MES 20 mM a pH 4,7 (el volumen total es de 10 ml). Este se activó con 1 g (5,2 mmol) de EDC en presencia de 345 mg de NHS (PM=115,09; 3 mmol). Después de 20 minutos de activación este se añadió a 40PLPEG537DA y el pH se ajustó a 7,8 usando NaOH 10 N. Después de 2 horas, se añadieron 2 g adicionales de EDC y se permitió que reaccionaran durante una noche. El grupo amino total se midió y se descubrió que era 0,03 mmol lo que se compara con 1,63 mmol de grupos amino originales antes de la reacción. La muestra se lavó con 20 cambios de volumen de agua usando un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A; GE-Amersham), se esterilizó por filtrado (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y se liofilizó proporcionando 4,1 g de 40PLPEG537DA.

**Ejemplo 18: Síntesis de 40PLPEG537NDASO o 40PLPEG537NDASF o 40PLPEG537NDAPO:** Esta estructura comprende polilisina de 40 kDa en la que el 37 % de los grupos amino están unidos covalentemente con MPEG de 5 kDa y los grupos amino restantes están unidos covalentemente con uno de los grupos carbonilo de NTA y los grupos carbonilo restantes de NTA se modifican para contener grupos sulfato (o sulfonato o fosfato). Esencialmente, cada NTA actúa como un espaciador para permitir que un agrupamiento de dos grupos sulfato (sulfonato o fosfato) se unan con la cadena principal de polilisina (también pueden usarse otras cadenas principales). El 40PLPEG537NDA puede convertirse en vehículo sulfatado (sulfonatado o fosforilado) que contiene hasta dos grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) en cada agrupamiento. Para hacer esto, tomar 2 gramos del vehículo (40PLPEG537NDA) y disolverlos en 50 ml de tampón de MES 10 mM (pH 4,7). Activar el vehículo añadiendo 0,19 g de NHSS (PM=217,14; 0,87 mmol), seguido de 0,37 g de EDC (PM=191,71; 1,9 mmol) y permitir que se activen durante 20 minutos. En un recipiente separado disolver 0,25 g de 2-aminoetilhidrogenosulfato (AES; PM=141; 1,85 mmol) o 0,31 g de ácido sulfanílico (SNA; PM=173; 1,8 mmol) o 0,25 g de O-fosforiletanolamina (OPE; PM=141; 1,8 mmol) en 25 ml de tampón de HEPES 1 M (pH 7,3, ajustar el pH a 7,8 usando NaOH) y medir los grupos amino de partida mediante TNBS (Spadaro *et al.*, 1979, Anal. Chem., 96, p317-329) que debería ser aproximadamente 1,8 mmol dependiendo de la pureza de AES (o SNA u OPE). Añadir la solución de AES (SNA u OPE) al vehículo después de 20 minutos de activación del vehículo. Después de 2 horas añadir otros 0,37 g de EDC y agitar la solución durante una noche. Medir los grupos amino mediante TNBS para determinar la cantidad de reducción de grupos amino que es equivalente a la cantidad de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) incorporados. Lavar el vehículo sulfatado (o sulfonatado o fosforilado) mediante 20 volúmenes de agua usando un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A; GE-Amersham), esterilizar por filtrado (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Este producto (40PLPEG537NDASO o 40PLPEG537NDASF o 40PLPEG537NDAPO) tendrá un agrupamiento de hasta 2 grupos sulfato (sulfonato o fosfato) colgantes de la cadena principal.

**Ejemplo 19: Síntesis de 20PLPEG500DTPANTA:** El 20PLPEG500DTPANTA se usará como el material de partida para la síntesis de algunas de las composiciones de núcleo aniónico de la presente invención. Esta estructura comprende polilisina de 20 kDa en la que el 50 % de los grupos amino están unidos covalentemente con MPEG de 5 kDa y los grupos amino restantes están unidos covalentemente con uno de los grupos carbonilo

de DTPA. Los grupos carbonilo restantes de DTPA están unidos con el grupo amino épsilon de biscarboximetil lisina. Para hacer esto: a) se disolvieron 1 ml o 0,4 g equivalentes de 20PL (Q4926 SAFC lote N.º 018K7775; DP=126; se descubrió que 0,4 g contenían 0,895 mmol de NH<sub>2</sub> mediante TNBS) en 5 ml de HEPES 1 M. Esta es la solución de 20PL. b) En un recipiente separado, se activaron 2,5 g de MPEG en MES 20 mM pH=4,7 (35 ml) añadiendo 125 mg de NHS (PM=115,14; 1,09 mmol) y 500 mg de EDC (PM=191,71; 2,60 mmol) con agitación. Se permitió que la activación continuara durante 20 minutos y el MPEGC activado se añadió directamente a solución de 20PL en la etapa a. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a pH 7,1 lentamente con NaOH 10 N gota a gota, y se permitió que reaccionara durante una noche. El análisis de grupos amino mediante TNBS mostró que permanecen 0,464 mmol de grupos amino, lo que indica saturación de PEG del 50 %. Esta es la solución de 20PLPEG550DA. c) Cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) eluida con solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min mostró un tiempo de retención de 12,8 min en detector de índice refractario o aproximadamente 14,4 nm de diámetro molecular. d) Se añadió dianhídrido de ácido dietilentríaminopentaacético (1 gramo; PM=357,3; 2,80 mmol) y se valoró lentamente con NaOH 10 N hasta pH 7,1 y se agitó durante 2 horas. Después de 2 horas, la medición del grupo amino mediante TNBS indicó que permanece el 0 % de grupos amino. e) El pH de la solución se ajustó a 7,5 usando NaOH 10 N para facilitar el lavado ya que permanecen cristales de DTPA que no han reaccionado. La solución se concentró hasta 100 ml y se lavó con 15 cambios de agua usando un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100.000 (UFP-100-E-5A; GE-Amersham) y se liofilizó. La cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) eluida con solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contienen acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min mostró un tiempo de retención de 12,7 min en un detector de índice refractario o aproximadamente 15,04 nm de diámetro molecular. f) Se disolvieron 2 gramos de NTA-amina (Nalfa,Nalfa, -bis(carboximetil)-L-Lisina; PM = 262,26 + 50 % de impureza, hasta 2 mol de agua y 10 % inorgánico) o ~4 mmol de grupos amino en 10 ml de HEPES 1 M. El análisis de grupos amino mediante TNBS indicó que la solución de NTA-amina contiene 3,4 mmol de grupos amino. g) Se disolvió 20PLPEG550DTPA (0,70 mmol de carboxilo) en 10 ml de MES 20 mM, se añadieron 140 mg de NHS (PM=115,09; 1,2 mmol), seguido de 560 mg de EDC (PM=191,71; 2,9 mmol). El pH aumentó lentamente pero se mantuvo por debajo de 5,5 mediante HCl. Esta solución se añadió a solución de NTA y el pH se ajustó hasta pH 7,1 con NaOH 10 N. Después de 2 horas, el análisis de grupos amino mostró un total de 3,2 mmol de grupos amino restantes, lo que indica que se incorporaron 0,2 mmol de NTA-amina a 0,8 mg de vehículo. h) La solución se concentró hasta 100 ml y se lavó con 15 cambios de agua usando un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100.000 (UFP-100-E-5A; GE-Amersham), se esterilizó por filtrado (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y se liofilizó produciendo 0,5 g (20PLPEG550DTPANTA;). El análisis mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) eluido con solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min mostró un tiempo de retención de 12,7 min en un detector de índice refractario o aproximadamente 15,04 nm de diámetro molecular.

**Ejemplo 20: Síntesis de 20PLPEG550DTPANTASO o 20PLPEG550DTPANTASF o 20PLPEG550DTPANTAPO:** Esta estructura comprende polilisina de 20 kDa en la que el 50 % de los grupos amino están unidos covalentemente con MPEG de 5 kDa y los grupos amino restantes están unidos covalentemente con uno de los grupos carbonilo de DTPA y los grupos carbonilo restantes de DTPA están unidos con el grupo amino épsilon de carboximetil lisina. La carboximetil lisina se modifica adicionalmente para contener tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato), cada uno unido con los grupos carboxilo de carboxilmetil lisina. Esencialmente, cada DTPA(NTA)<sub>3</sub> actúa como un espaciador para permitir que un agrupamiento de doce grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) se una a la cadena principal de polilisina (también pueden usarse otras cadenas principales). El producto (20PLPEG550DTPANTA) puede convertirse en vehículo sulfatado (o sulfonatado o fosforilado) que contiene hasta doce grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) en cada agrupamiento. Para hacer esto, tomar 2 gramos del vehículo (20PLPEG550DTPANTA) y disolverlos en 50 ml de tampón de MES 10 mM (pH 4,7). Activar el vehículo añadiendo 1,1 g de NHSS (PM=217,14; 5,1 mmol), seguido de 2,2 g de EDC (PM=191,71; 11,5 mmol) y permitir que se activen durante 20 minutos. En un recipiente separado disolver 1,5 g de 2-aminoetilhidrogenosulfato (AES; PM=141; 10,6 mmol) o 1,8 g de ácido sulfanílico (SNA; PM=173; 10,6 mmol) o 1,5 g de O-fosforiletanolamina (OPE; PM=141; 10,6 mmol) en 25 ml de tampón de HEPES 1 M (pH 7,3, ajustar el pH a 7,8 usando NaOH) y medir los grupos amino de partida mediante TNBS (Spadaro *et al.*, 1979, Anal. Chem., 96, p317-329) que debería ser aproximadamente 10,6 mmol, dependiendo de la pureza de AES (SNA u OPE). Después de 20 minutos de activación del vehículo, añadir el vehículo a solución de AES (o SNA u OPE). Después de 2 horas añadir otros 2,2 g de EDC y agitar la solución durante una noche. Medir los grupos amino mediante TNBS para determinar la cantidad de reducción de grupos amino que es equivalente a la cantidad de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) incorporados. Lavar el vehículo sulfatado (o sulfonatado o fosforilado) mediante 20 volúmenes de agua usando un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A; GE-Amersham), esterilizar por filtrado (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Este producto (20PLPEG550DTPANTASO o 20PLPEG550DTPANTASF o 20PLPEG550DTPANTAPO) tendrá agrupamientos de hasta doce grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) cada uno colgante de la cadena principal.

**Ejemplo 21: Síntesis de 35PEPEG1035NTA:** El 35PEPEG1035NTA se usará como el material de partida para la síntesis de algunas de las composiciones de núcleo aniónico de la presente invención. Esta composición tiene ácido poliglutámico (Sigma Chem. Co. St Luis Mo. Cat. N.º P4033, PM=15-50 kDa; o Fisher Chem Co. Pittsburg, PA, Cat. N.º ICN15191891, PM=15-50 kDa) como la cadena principal polimérica con 35 % del grupo carboxilo ocupado con MPEGAM de 10 kDa (PM=10 kDa MPEG con grupo amino en el extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat.

N.º P1AM-10) y los grupos carboxilo restantes ocupados con ácido nitrilotriacético. Para sintetizar 35PEPEG1035NTA, medir el grupo carboxilo de partida (1 equivalente) de 1,0 g de ácido poliglutámico según el protocolo de Kobayashi y Chiba (Analytical biochemistry 1994, vol 219, p189-194). Tomar 1,0 g de ácido poliglutámico (Sigma Chem. Co. St Luis Mo. Cat. N.º P4033; PM=15-50 kDa, con 1 equivalente de grupo carboxilo/gramo), disolver en 25 ml de tampón de MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, Pierce, Rockford, IL) 10 mM a pH 4,7, añadir 1 equivalente de NHS (PM=115,14) y 1 equivalente de EDC (PM=191,71) y agitar para activar PE durante 20 minutos. En un recipiente separado, disolver 0,35 equivalentes de MPEGAM (PM=10 kDa MPEG con grupo amino en el extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat. N.º P1AM-10) en 20 ml de HEPES 0,2 M, pH 7,8 para obtener solución de MPEGAM. Después de 20 minutos de activación de PE, añadir PE a la solución de MPEGAM y permitir que la reacción continúe durante 2 horas. Medir los grupos amino restantes del MPEGAM mediante TNBS y no debería haber ninguno lo que indica que se han consumido los 0,35 equivalentes del grupo amino y se han conjugado con el ácido poliglutámico. Si hubiera grupo amino restante, ajustar el pH a 5 con HCl 6 N y añadir 1 equivalente de EDC (PM=191,71), después de 20 minutos ajustar de nuevo el pH a 7,8 y permitir que reaccione durante una noche. Tomar una alícuota de la solución de 35PEPEG1035 resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene acetonitrilo al 15 % como un disolvente de elución a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 16-24 nm. Ajustar el pH a 5 con HCl 6 N y añadir 1,5 equivalentes de EDC (PM=191,71) y activar durante 20 minutos. Después de 20 minutos añadir esta solución de 40PEPEG1035 activada a 10 equivalentes de Nalfa,Nalfa-biscarboximetil-lisina (PM=262 Da) en 25 ml de tampón de HEPES 0,2 M a pH 7,8 y permitir que reaccione durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción a 100 ml y lavar con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A). Esterilizar por filtrado la muestra usando (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Preparar una solución de 10 mg/ml de 35PEPEG1035NTA resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato como disolvente de elución (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene Acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 19-28 nm.

**Ejemplo 22: Síntesis de 35PGPEG1035NTASO o 35PGPEG1035NTASF o 35PGPEG1035NTAPO:** Esta estructura comprende poliglutamato de 35 kDa en el que el 35 % de los grupos carboxilo están unidos covalentemente con MPEG 10 kDa y los grupos carboxilo restantes están unidos covalentemente al grupo amino épsilon de biscarboximetil-lisina que es un derivado de ácido nitrilotriacético (NTA). El NTA se modifica adicionalmente para contener tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato), cada uno unido con los grupos carbonilo de NTA. Esencialmente, cada NTA actúa como un espaciador para permitir que un agrupamiento de tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) se una con la cadena principal de poliglutamato (también pueden usarse otras cadenas principales). El 35PGPEG1035NTA puede convertirse en un vehículo sulfatado (o sulfonato o fosforilado) que contiene agrupamientos de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) con hasta tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) en cada agrupamiento. Para hacer esto, tomar 2 gramos del vehículo (35PGPEG1035NTA) y disolverlos en 50 ml de tampón de MES 10 mM (pH 4,7). Activar el vehículo añadiendo 0,28 g de NHSS (PM=217,14; 1,3 mmol), seguido de 0,56 g de EDC (PM=191,71; 2,9 mmol) y permitir que se active durante 20 minutos. En un recipiente separado disolver 0,37 g de 2-aminoetilhidrogenosulfato (AES; PM=141; 2,6 mmol) o 0,45 g de ácido sulfanílico (SNA; PM=173; 2,6 mmol) o 0,37 g de O-fosforiletanolamina (OPE; PM=141; 2,6 mmol) en 25 ml de tampón de HEPES 1 M (pH 7,3, ajustar el pH a 7,8 usando NaOH) y medir los grupos amino de partida mediante TNBS (Spadaro *et al.*, 1979, Anal. Chem., 96, p317-329) que deberían ser de aproximadamente 2,6 mmol, dependiendo de la pureza de AES (o SNA u OPE). Después de 20 minutos de activación de vehículo, añadir el vehículo activado a solución de AES (o SNA u OPE). Después de 2 horas añadir otros 0,56 g de EDC y agitar la solución durante una noche. Medir los grupos amino mediante TNBS para determinar la cantidad de reducción de grupos amino que es equivalente a la cantidad de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) incorporados. Lavar el vehículo sulfatado (o sulfonato o fosforilado) mediante 20 volúmenes de agua usando un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A; GE-Amersham), esterilizar por filtrado (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Este producto (35PGPEG1035NTASO o 35PGPEG1035NTASF o 35PGPEG1035NTAPO) tendrá agrupamientos de hasta tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) cada uno colgante de la cadena principal.

**Ejemplo 23: Síntesis de 10PDPEG1035NTA:** El 10PDPEG1035NTA se usará como el material de partida para la síntesis de algunas de las composiciones de núcleo aniónico de la presente invención. Esta composición tiene ácido poliaspártico (Sigma Chem. Co. St Luis Mo. Cat. N.º P5378, PM=5-15 kDa) como la cadena principal polimérica con 35 % de los grupos carboxilo ocupados con MPEGAM de 10 kDa (PM=10 kDa MPEG con grupo amino en el extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat. N.º P1AM-10) y el grupo carboxilo restante ocupado con ácido nitrilotriacético. Medir el grupo carboxilo de partida 1 equivalente de 1,0 g de ácido poliglutámico según el protocolo de Kobayashi y Chiba (Analytical biochemistry 1994, vol 219, p189-194). Para sintetizar 10PDPEG1035NTA, tomar 1,0 g de ácido poliaspártico (Sigma Chem. Co. St Luis Mo. Cat. N.º P4033; PM=15-50 kDa, con 1 equivalente de grupo carboxilo/gramo) y disolver en 25 ml de tampón de MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, Pierce, Rockford, IL) 20 mM a pH 4,7 para realizar la solución de PD. Disolver 0,25 equivalentes de MPEGAM (PM=10 kDa MPEG con grupo amino en el extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat. N.º P1AM-10) en 20 ml de etanol al 80 % y añadir a la solución de PD para realizar la solución de PDPEG. A la solución de PDPEG, añadir 1 equivalente de NHS (PM=115,14) y 1 equivalente de EDC (PM=191,71) con agitación. Mantener el pH a pH 4,7-5,0 con HCl 6 N durante

20 minutos usando HCl. Después de 20 minutos de activación, ajustar el pH a 7,8 añadiendo 10 ml de HEPES 1 M, pH 7,4. Ajustar el pH a 7,8 con NaOH 10 N gota a gota. Permitir que la reacción continúe durante 2 horas y medir el grupo amino restante del MPEGAM mediante TNBS y no debería haber ninguno lo que indica que se han consumido los 0,35 equivalentes de grupo amino y se han conjugado con el ácido poliaspartico. Si hay grupos amino restantes, añadir 1 equivalente de EDC (PM=191,71) y permitir que reaccione durante una noche. Tomar una alícuota de la solución de 10PDPEG1035 resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene acetonitrilo al 15 % como disolvente de elución a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 12-18 nm. Ajustar el pH a 5 con HCl 6 N y añadir 1,5 equivalentes de EDC (PM=191,71) y activar durante 20 minutos. Después de 20 minutos, añadir esta solución de 10PDPEG1035 activada a 10 equivalentes de Nalfa,Nalfa-biscarboximetil-lisina (PM=262 Da) en hasta 25 ml de tampón de HEPES 1 M a pH 7,8 y permitir que reaccione durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción hasta 100 ml y lavar con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A). Esterilizar por filtrado la muestra usando (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Preparar una solución de 10 mg/ml de 10PDPEG1035NTA resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato como disolvente de elución (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene Acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser con un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 14-20 nm.

**Ejemplo 24. Síntesis de 10PDPEG1035NTASO o 10PDPEG1035NTASF o 10PDPEG1035NTAPO:** Esta estructura comprende poliaspartato de 10 kDa en el que el 35 % de los grupos carboxilo están unidos covalentemente con MPEG 10 kDa y los grupos carboxilo restantes están unidos covalentemente al grupo amino épsilon de biscarboximetil-lisina que es un derivado de ácido nitrilotriacético (NTA). El NTA está modificado adicionalmente para contener tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato), cada uno unido con los grupos carbonilo de NTA. Esencialmente, cada NTA actúa como un espaciador para permitir que un agrupamiento de tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) se unan con la cadena principal de poliaspartato (también pueden usarse otras cadenas principales). El 10PDPEG1035NTA puede convertirse en vehículo sulfatado (o sulfonato o fosforilado) que contiene agrupamientos de grupos sulfato con hasta tres grupos sulfato en cada agrupamiento. Para hacer esto, tomar 2 gramos del 10PDPEG1035NTA y disolverlos en 50 ml de tampón de MES 10 mM (pH 4,7). Activar el vehículo añadiendo 0,28 g de NHSS (PM=217,14; 1,3 mmol), seguido de 0,56 g de EDC (PM=191,71; 2,9 mmol) y permitir que se active durante 20 minutos. En un recipiente separado disolver 0,37 g de 2-aminoetilhidrogenosulfato (AES; PM=141; 2,6 mmol) o 0,45 g de ácido sulfanílico (SNA; PM=173; 2,6 mmol) o 0,37 g de O-fosforiletanolamina (OPE; PM=141; 2,6 mmol) en 25 ml de tampón de HEPES 1 M (pH 7,3, ajustar el pH a 7,8 usando NaOH) y medir los grupos amino de partida mediante TNBS (Spadaro *et al.*, 1979, Anal. Chem., 96, p317-329) lo que debería ser aproximadamente 2,6 mmol, dependiendo de la pureza de AES (o SNA u OPE). Añadir vehículo activado durante 20 minutos a la solución de AES (o SNA u OPE). Después de 2 horas añadir otros 0,56 g de EDC y agitar la solución durante una noche. Medir los grupos amino mediante TNBS para determinar la cantidad de reducción de grupos amino que es equivalente a la cantidad de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) incorporados. Lavar el vehículo sulfatado (o sulfonato o fosforilado) mediante 20 volúmenes de agua usando un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A; GE-Amersham), esterilizar por filtrado (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Este producto (10PDPEG1035NTASO o 10PDPEG1035NTASF o 10PDPEG1035NTAPO) tendrá agrupamientos de hasta tres grupos sulfato (sulfonato o fosfato) por agrupamiento que está colgante de la cadena principal.

**Ejemplo 25: Síntesis de 10PSPEG1035NTA:** El 10PSPEG1035NTA se usará como el material de partida para la síntesis de algunas de las composiciones de núcleo aniónico de la presente invención. Esta composición tiene poliserina (Sigma Chem. Co. St Luis Mo. Cat. N.º P5857, PM=5-15 kDa) como la cadena principal polimérica con 35 % de los grupos hidroxilo ocupados con MPEGAM de 10 kDa (PM=10 kDa MPEG con grupo amino en el extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat. N.º P1AM-10) y el grupo hidroxilo restante ocupado con ácido nitrilotriacético. Para preparar esta composición todos los grupos hidroxilo se convirtieron en grupos carboxilo usando anhídrido succínico. En resumen, disolver 1 g de poliserina en 25 ml de dioxano y añadir 5,2 gramos de anhídrido succínico (exceso molar quintuple con respecto al grupo hidroxilo teórico) y 900 mg de N,N'-dimetilaminopiridina como catalizador e incubar la mezcla a 60 °C durante 3 horas. Retirar el dioxano mediante evaporación rotatoria a 40 °C, disolver el sólido en agua, neutralizar con NaOH y lavar con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 3 kDa (UFP-3-E-5A). Esterilizar por filtrado el producto resultante (PS) usando (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Medir el grupo carboxilo de partida (1 equivalente) en 1,0 g de PS según el protocolo de Kobayashi y Chiba (Analytical biochemistry 1994, vol 219, p189-194). Para sintetizar 10PSPEG1035NTA, tomar 1,0 g de PS (con 1 equivalente de grupo carboxilo), disolver en 25 ml de tampón de MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, Pierce, Rockford, IL) 10 mM a pH 4,7 (solución de PS), añadir 1 equivalente de NHS (PM=115,14) y 1 equivalente de EDC (PM=191,71; 4 mmol) y agitar durante 20 minutos para activar. En un recipiente separado, disolver 0,35 equivalentes de MPEGAM (PM=10 kDa MPEG con grupo amino en el extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat. N.º P1AM-10) en 20 ml de HEPES 0,2 M a pH 7,8 para preparar la solución de MPEGAM. Después de 20 minutos de activación de PS, añadir solución de PS a la solución de MPEGAM y permitir que la reacción continúe durante 2 horas. Medir el grupo amino restante del MPEGAM mediante TNBS y no debería haber ninguno lo que indica que se han consumido los 0,35 equivalentes de grupo amino de MPEGAM



y se han conjugado con el PS. Si hay grupos amino restantes, ajustar el pH a 5 con HCl 6 N y añadir 1 equivalente de EDC (PM=191,71), después de 20 minutos ajustar de nuevo el pH a 7,8 y permitir que reaccione durante una noche. Tomar una alícuota de la solución de 10PSPEG1035 resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene Acetonitrilo al 15 % como disolvente de elución a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser con diámetro hidrodinámico de aproximadamente 13-18 nm. Ajustar el pH a 5 con HCl 6 N y añadir 1,5 equivalentes de EDC (PM=191,71) y activar durante 20 minutos. Después de 20 minutos añadir esta solución de 10PSPEG1035 activada a 10 equivalentes de Nalfa,Nalfa-biscarboximetil-lisina (PM=262 Da) en hasta 25 ml de tampón de HEPES 0,2 M a pH 7,8 y permitir que reaccione durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción hasta 100 ml y lavar con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A). Esterilizar por filtrado la muestra usando (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Preparar una solución de 10 mg/ml de 10PSPEG1035NTA resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato como disolvente de elución (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene Acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser con diámetro hidrodinámico de aproximadamente 14-19 nm.

**Ejemplo 26: Síntesis de 10PSPEG1035NTASO o 10PSPEG1035NTASF o 10PSPEG1035NTAPO:** Esta estructura comprende poliserina de 10 kDa en la que el 35 % de los grupos hidroxilo están unidos covalentemente con MPEG de 10 kDa y los grupos hidroxilo restantes están unidos covalentemente al grupo amino épsilon de biscarboximetil-lisina que es un derivado de ácido nitrilotriacético (NTA). El NTA se modifica adicionalmente para contener tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato), cada uno unido con los grupos carbonilo de NTA. Esencialmente, cada NTA actúa como un espaciador para permitir que un agrupamiento de tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) se unan con la cadena principal de poliaspartato (también pueden usarse otras cadenas principales). El 10PSPEG1035NTA (véase anteriormente) puede convertirse en vehículo sulfatado (o sulfonatado o fosfatado) que contiene agrupamientos de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) con hasta tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) en cada agrupamiento. Para hacer esto, tomar 2 gramos del 10PSPEG1035NTA (anterior) y disolverlos en 50 ml de tampón de MES 10 mM (pH 4,7). Activar el vehículo mediante la adición de 0,28 g de NHSS (PM=217,14; 1,3 mmol), seguido de 0,56 g de EDC (PM=191,71; 2,9 mmol) y permitir que se active durante 20 minutos. En un recipiente separado disolver 0,37 g de 2-aminoetilhidrogenosulfato (AES; PM=141; 2,6 mmol) o 0,45 g de ácido sulfanílico (SNA; PM=173; 2,6 mmol) o 0,37 g de O-fosforiletanolamina (OPE; PM=141; 2,6 mmol) en 25 ml de tampón de HEPES 1 M (pH 7,3, ajustar el pH a 7,8 usando NaOH) y medir los grupos amino de partida mediante TNBS (Spadaro *et al.*, 1979, Anal. Chem., 96, p317-329) que debería ser aproximadamente 2,6 mmol, dependiendo de la pureza de AES (o SNA u OPE). Añadir vehículo activado durante 20 minutos a la solución de AES (o SNA u OPE). Después de 2 horas añadir otros 0,56 g de EDC y agitar la solución durante una noche. Medir los grupos amino mediante TNBS para determinar la cantidad de reducción de grupos amino que es equivalente a la cantidad de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) incorporados. Lavar el vehículo sulfatado (o sulfonatado o fosforilado) mediante 20 volúmenes de agua usando un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A; GE-Amersham), esterilizar por filtrado (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Este producto (10PSPEG1035NTASO o 10PSPEG1035NTASF o 10PSPEG1035NTAPO) tendrá agrupamientos de hasta tres grupos sulfato (sulfonato o fosfato) por agrupamiento colgante de la cadena principal.

**Ejemplo 27: Síntesis de 10PTPEG1035NTA:** El 10PTPEG1035NTA se usará como el material de partida para la síntesis de algunas de las composiciones de núcleo aniónico de la presente invención. Esta composición tiene politreonina (Sigma Chem. Co. St Luis Mo. Cat. N.º P8077, PM=5-15 kDa) como la cadena principal polimérica con el 35 % de los grupos hidroxilo ocupados con MPEGAM de 10 kDa (PM=10 kDa MPEG con grupo amino en el extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat. N.º P1AM-10) y el grupo hidroxilo restante ocupado con ácido nitrilotriacético. Para preparar esta composición todos los grupos hidroxilo se convertirán en grupo carboxilo usando anhídrido succínico. En resumen, disolver 1 g de politreonina en 25 ml de dioxano y añadir 4,5 gramos de anhídrido succínico (exceso molar quintuple con respecto al grupo hidroxilo teórico) en 1 gramo de politreonina) y 900 mg de N,N'-dimetilaminopiridina como catalizador e incubar la mezcla a 60 °C durante 3 horas. Retirar dioxano mediante evaporación rotatoria a 40 °C, disolver el sólido en agua, neutralizado con NaOH y lavar con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 3 kDa (UFP-3-E-5A). Esterilizar por filtrado el producto resultante (PT) usando (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar para obtener PT. Medir el grupo carboxilo de partida (1 equivalente) en 1,0 g de PT según el protocolo de Kobayashi y Chiba (Analytical biochemistry 1994, vol 219, p189-194). Para sintetizar 10PTPEG1035NTA, tomar 1,0 g de PT (con 1 equivalente de grupo carboxilo), disolver en 25 ml de tampón de MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, Pierce, Rockford, IL) 10 mM a pH 4,7 (solución de PT), añadir 1 equivalente de NHS (PM=115,14), 1 equivalente de EDC (PM=191,71; 4 mmol) y permitir que se active durante 20 minutos. En un recipiente separado, disolver 0,35X mmol de MPEGAM (PM=10 kDa MPEG con grupo amino en el extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat. N.º P1AM-10) en 20 ml de HEPES 0,2 M, pH 7,8 para preparar solución de MPEGAM. Después de 20 minutos de activación de PT, añadir solución de PT a la solución de MPEGAM y permitir que la reacción continúe durante 2 horas. Medir el grupo amino restante del MPEGAM mediante TNBS y debería ser ninguno lo que indica que se han consumido los 0,35 equivalentes del grupo amino y se han conjugado con el PT. Si hay grupos amino restantes, ajustar el pH a 5 con HCl 6 N y añadir 1 equivalente de EDC (PM=191,71), después de 20 minutos ajustar el pH de nuevo hasta 7,8 y permitir que reaccionen durante una noche. Tomar una alícuota de la solución de 10PTPEG1035 resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando columna

TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene Acetonitrilo al 15 % como disolvente de elución a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 12-18 nm. Ajustar el pH a 5 con HCl 6 N y añadir 1,5 equivalentes de EDC (PM=191,71) y activar durante 20 minutos. Después de 20 minutos añadir esta solución de 10PTPEG1035 activada a 10 equivalentes de Nalfa,Nalfa-biscarboximetil-lisina (PM=262 Da) en hasta 25 ml de tampón de HEPES 0,2 M a pH 7,8 y permitir que reaccione durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción hasta 100 ml y lavar con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A). Esterilizar por filtrado el producto de 10PTPEG1035NTA (usando filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Preparar una solución de 10 mg/ml de 10PTPEG1035NTA resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato como disolvente de elución (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene Acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con diámetro hidrodinámico de aproximadamente 14-20 nm.

**Ejemplo 28: Síntesis de 10PTPEG1035NTASO o 10PTPEG1035NTASF o 10PTPEG1035NTAPO:** Esta estructura comprende politreonina de 10 kDa en la que el 35 % de los grupos hidroxilo están unidos covalentemente con MPEG de 10 kDa y los grupos hidroxilo restantes están unidos covalentemente al grupo amino épsilon de biscarboximetil-lisina que es un derivado de ácido nitrilotriacético (NTA). El NTA está modificado adicionalmente para contener tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato), cada uno unido con los grupos carbonilo de NTA. Esencialmente, cada NTA actúa como un espaciador para permitir que un agrupamiento de tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) se unan con la cadena principal de politreonina (también pueden usarse otras cadenas principales). El 10PTPEG1035NTA (véase anteriormente) puede convertirse en vehículo sulfatado (o sulfonatado o fosfatado) que contiene agrupamientos de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) con hasta tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) en cada agrupamiento. Para hacer esto, tomar 2 gramos del 10PTPEG1035NTA y disolverlos en 50 ml de tampón de MES 10 mM (pH 4,7). Activar el vehículo mediante la adición de 0,28 g de NHSS (PM=217,14; 1,3 mmol), seguido de 0,56 g de EDC (PM=191,71; 2,9 mmol) y permitir que se active durante 20 minutos. En un recipiente separado disolver 0,37 g de 2-aminoetilhidrogenosulfato (AES; PM=141; 2,6 mmol) o 0,45 g de ácido sulfanílico (SNA; PM=173; 2,6 mmol) o 0,37 g de O-fosforiletanolamina (OPE; PM=141; 2,6 mmol) en 25 ml de tampón de HEPES 1 M (pH 7,3, ajustar el pH a 7,8 usando NaOH) y medir los grupos amino de partida mediante TNBS (Spadaro *et al.*, 1979, Anal. Chem., 96, p317-329) que debería ser aproximadamente 2,6 mmol, dependiendo de la pureza de AES (o SNA u OPE). Añadir vehículo activado durante 20 minutos a la solución de AES (o SNA u OPE). Después de 2 horas añadir otros 0,56 g de EDC y agitar la solución durante una noche. Medir los grupos amino mediante TNBS para determinar la cantidad de reducción de grupos amino que es equivalente a la cantidad de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) incorporados. Lavar el vehículo sulfatado (o sulfonatado o fosforilado) mediante 20 volúmenes de agua usando un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A; GE-Amersham), esterilizar por filtrado (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Este producto (10PTPEG1035NTASO o 10PTPEG1035NTASF o 10PTPEG1035NTAPO) tendrá agrupamientos de hasta tres grupos sulfato (sulfonato o fosfato) por agrupamiento colgante de la cadena principal.

**Ejemplo 29: Síntesis de 20PYPEG1035NTA:** El 20PYPEG1035NTA se usará como el material de partida para la síntesis de otras composiciones del núcleo aniónico de la presente invención. Esta composición tiene politirosina (Sigma Chem. Co. St Luis Mo. Cat. N.º 1800, PM=10-40 kDa) como la cadena principal polimérica con el 35 % de los grupos hidroxilo ocupados con MPEGAM de 10 kDa (PM=10 kDa MPEG con un grupo amino en el extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat. N.º P1AM-10) y el grupo hidroxilo restante ocupado con ácido nitrilotriacético. Para preparar esta composición todos los grupos hidroxilo se convertirán en grupos carboxilo usando anhídrido succínico. En resumen, disolver 1 g de politirosina en 25 ml de dioxano y añadir 2,9 gramos de anhídrido succínico (exceso molar quintuple con respecto al grupo hidroxilo teórico en 1 gramo de politirosina) y 900 mg de N,N'-dimetilaminopiridina como catalizador e incubar la mezcla a 60 °C durante 3 horas. Retirar el dioxano mediante evaporación rotatoria a 40 °C, disolver el sólido en agua, neutralizar con NaOH y lavar con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 3 kDa (UFP-3-E-5A). Esterilizar por filtrado el producto resultante (PY) usando (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar para obtener PY. Medir el grupo carboxilo de partida (1 equivalente) en 1,0 g de PY según el protocolo de Kobayashi y Chiba (Analytical biochemistry 1994, vol 219, p189-194). Para sintetizar 20PYPEG1035NTA, tomar 1,0 g de PY (con 1 equivalente de grupo carboxilo) y disolver en 25 ml de tampón de MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, Pierce, Rockford, IL) 10 mM a pH 4,7 (solución de PY), añadir 1 equivalente de NHS (PM=115,14) y 1 equivalente de EDC (PM=191,71) y agitar durante 20 minutos para activar. En un recipiente separado, disolver 0,35 equivalentes de MPEGAM (PM=10 kDa MPEG con grupo amino en el extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat. N.º P1AM-10) en 20 ml de tampón de HEPES 0,2 M a pH 7,8 para preparar una solución de MPEGAM. Añadir solución de PY activada a la solución de PY y permitir que la reacción continúe durante 2 horas. Medir el grupo amino restante del MPEGAM mediante TNBS y debería ser ninguno lo que indica que se han consumido los 0,35 equivalentes de grupos amino y se han conjugado con el PY. Si existen grupos amino restantes, ajustar el pH a 5 con HCl 6 N y añadir 1 equivalente de EDC (PM=191,71), después de 20 minutos ajustar de nuevo el pH a 7,8 y permitir que reaccione durante una noche. Tomar una alícuota de la solución de 20PYPEG1035 resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene Acetonitrilo al 15 % como disolvente de elución a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 13-18 nm. Ajustar el pH a 5 con HCl 6 N y añadir

1,5 equivalentes de EDC (PM=191,71) y activar durante 20 minutos. Después de 20 minutos añadir este a 10 equivalentes de Nalfa,Nalfa-bis-carboximetil-lisina (PM=262 Da) en hasta 25 ml de tampón de HEPES 0,2 M a pH 7,8 y permitir que reaccione durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción hasta 100 ml y lavar con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A). Esterilizar por filtrado la muestra usando (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Preparar una solución de 10 mg/ml de 20PYPEG1035NTA resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato como disolvente de elución (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene Acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 14-20 nm.

**Ejemplo 30: Síntesis de 20PYPEG1035NTASO o 20PYPEG1035NTASF o 20PYPEG1035NTAPO:** Esta estructura comprende politirosina de 20 kDa en la que el 35 % de los grupos hidroxilo están unidos covalentemente con MPEG de 10 kDa y los grupos hidroxilo restantes están unidos covalentemente al grupo amino épsilon de bis-carboximetil-lisina que es un derivado de ácido nitrilotriacético (NTA). El NTA se modifica adicionalmente para contener tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato), cada uno unido con los grupos carbonilo de NTA. Esencialmente, cada NTA actúa como un espaciador para permitir que un agrupamiento de tres grupos sulfato se una con la cadena principal de politirosina (también pueden usarse otras cadenas principales). El 20PYPEG1035NTA (véase anteriormente) puede convertirse en vehículo sulfatado (o sulfonatado o fosforilado) que contiene agrupamientos de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) con hasta tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) en cada agrupamiento. Para hacer esto, tomar 2 gramos del 20PYPEG1035NTA y disolverlos en 50 ml de tampón de MES 10 mM (pH 4,7). Activar el vehículo añadiendo 0,28 g de NHSS (PM=217,14; 1,3 mmol), seguido de 0,56 g de EDC (PM=191,71; 2,9 mmol) y permitir que se active durante 20 minutos. En un recipiente separado disolver 0,37 g de 2-aminoetilhidrogenosulfato (AES; PM=141; 2,6 mmol) o 0,45 g de ácido sulfanílico (SNA; PM=173; 2,6 mmol) o 0,37 g de O-fosforiletanolamina (OPE; PM=141; 2,6 mmol) en 25 ml de tampón de HEPES 1 M (pH 7,3, ajustar el pH a 7,8 usando NaOH) y medir los grupos amino de partida mediante TNBS (Spadaro *et al.*, 1979, Anal. Chem., 96, p317-329) que debería ser aproximadamente 2,6 mmol, dependiendo de la pureza de AES (o SNA u OPE). Añadir vehículo activado durante 20 minutos a la solución de AES (o SNA u OPE). Después de 2 horas añadir otros 0,56 g de EDC y agitar la solución durante una noche. Medir los grupos amino mediante TNBS para determinar la cantidad de reducción de grupos amino que es equivalente a la cantidad de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) incorporados. Lavar el vehículo sulfatado (o sulfonatado o fosforilado) mediante 20 volúmenes de agua usando un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A; GE-Amersham), esterilizar por filtrado (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Este producto (20PYPEG1035NTASO o 20PYPEG1035NTASF o 20PYPEG1035NTAPO) tendrá agrupamientos de hasta tres grupos sulfato (sulfonato o fosfato) por agrupamiento colgante de la cadena principal.

**Ejemplo 31: Síntesis de 20PCPEG1035DTPA:** El 20PCPEG1035DTPA se usará como el material de partida para la síntesis de otras composiciones de núcleo aniónico de la presente invención. Esta composición tiene policisteína (Sigma Chem. Co. St Luis Mo. Cat. N.º P1800, PM=10-40 kDa) como la cadena principal polimérica con el 35 % de los grupos tiol ocupados con MPEGAM de 10 kDa (PM=10 kDa; SunBright; ME-100HS; lote N.º M62503; limpio en solución) y el grupo tiol restante ocupado con ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA). Para preparar esta composición todos los grupos tiol se convertirán en grupo amino usando Aminoetil-8 (N-(yodoetil) trifluoroacetamida (Pierce, Rockford, IL, Cat. N.º 23010). En resumen, disolver 1 g de policisteína en 25 ml de tampón de tricina 20 mM a pH 8,5 y añadir 4,7 gramos de Aminoetil-8 (N-(yodoetil) trifluoroacetamida (exceso molar doble con respecto al grupo tiol teórico en 1 gramo de policisteína) e incubar la mezcla a temperatura ambiente durante 3 horas. Lavar 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 3 kDa (UFP-3-E-5A). Esterilizar por filtrado el producto resultante (PC) usando (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar para obtener PC. Medir el grupo amino de partida (1 equivalente) en 1,0 g de PC usando TNBS como anteriormente. Para sintetizar 20PCPEG1035DTPA, tomar 1,0 g de PC (con 1 equivalente de grupo amino) y disolver en 25 ml de tampón de HEPES 0,2 M a pH 7,8 (Pierce, Rockford, IL) para obtener una solución de 20 PC. En un recipiente separado, disolver 0,35 equivalentes de MPEGAM (PM=10 kDa; MetoxiPEG con grupo carboxilo en el extremo; de Lysan bio; Arab, AL) en 60 ml de MES 10 mM a pH=4,7, añadir 0,5 equivalentes de NHS (PN=115,14), una vez disuelto añadir 1 equivalente de EDC (PM=191,71; 10,43 mmol) agitando al mismo tiempo y permitir que la activación continúe durante 20 minutos. Añadir MPEGC activado directamente a la solución de 20PC, permitir que la reacción se produzca durante 2 horas y medir los grupos amino mediante TNBS para asegurar el 35 % de saturación de grupos amino, de otro modo añadir más de la cantidad apropiada de MPEGC activado. Esta es la solución de 20PCPEG1035. Realizar cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) con solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene elución de Acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 14-17 nm. Añadir 5 equivalentes de dianhídrido de DTPA (PM=357,32; Sigma Chem Co., St Louis, MO. Cat. N.º 284025) seguido de 200 µl de TEA. Valorar la reacción lentamente con NaOH 10 N hasta pH 7,8 y agitar durante 4 horas. Usando reacción de TNBS, confirmar que no permanece ningún grupo amino lo que es indicativo de una reacción completa y que se ha preparado el producto de 20PCPEG1035DTPA. Realizar cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) con solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene elución de Acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con un diámetro molecular de 17-21 nm. Lavar el 20PCPEG1035DTPA resultante con 15 volúmenes de agua usando un cartucho de ultrafiltración de PCPM de

100.000 (UFP-100-E-5A; GE-Amersham) y liofilizar.

**Ejemplo 32: Síntesis de 20PCPEG1035DTPASO o 20PCPEG1035DTPASF o 20PCPEG1035DTPAPO:** Esta estructura comprende policisteína de 20 kDa en la que el 35 % de los grupos tiol están unidos covalentemente con MPEG de 10 kDa y los grupos tiol restantes están unidos covalentemente con uno de los grupos carbonilo del ácido etilendiamintetraacético (DTPA). El DTPA se modifica adicionalmente para contener cuatro grupos sulfato (o sulfonato o fosfato), cada uno unido con los grupos carbonilo de DTPA. Esencialmente, cada DTPA actúa como un espaciador para permitir que un agrupamiento de cuatro grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) se una con la cadena principal de policisteína (también pueden usarse otras cadenas principales). El 20PCPEG1035DTPA (véase anteriormente) puede convertirse en vehículo sulfatado (o sulfonatado o fosforilado) que contiene agrupamientos de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) con hasta cuatro grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) en cada agrupamiento. Para hacer esto, tomar 2 gramos del 20PCPEG1035DTPA y disolverlo en 50 ml de tampón de MES 10 mM (pH 4,7). Activar el vehículo añadiendo 0,28 g de NHSS (PM=217,14; 1,3 mmol), seguido de 0,56 g de EDC (PM=191,71; 2,9 mmol) y permitir que se active durante 20 minutos. En un recipiente separado disolver 0,37 g de 2-aminoetilhidrogenosulfato (AES; PM=141; 2,6 mmol) o 0,45 g de ácido sulfanílico (SNA; PM=173; 2,6 mmol) o 0,37 g de O-fosforiletanolamina (OPE; PM=141; 2,6 mmol) en 25 ml de tampón de HEPES 1 M (pH 7,3, ajustar el pH a 7,8 usando NaOH) y medir los grupos amino de partida mediante TNBS (Spadaro *et al.*, 1979, Anal. Chem., 96, p317-329) que deberían ser aproximadamente 2,6 mmol, dependiendo de la pureza de AES (o SNA u OPE). Añadir vehículo activado durante 20 minutos a la solución de AES (o SNA u OPE). Después de 2 horas añadir otros 0,56 g de EDC y agitar la solución durante una noche. Medir los grupos amino mediante TNBS para determinar la cantidad de reducción de grupos amino que es equivalente a la cantidad de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) incorporados. Lavar el vehículo sulfatado (o sulfonatado o fosforilado) mediante 20 volúmenes de agua usando un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A; GE-Amersham), esterilizar por filtrado (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Este producto (20PCPEG1035DTPASO o 20PCPEG1035DTPASF o 20PCPEG1035DTPAPO) tendrá agrupamientos de hasta cuatro grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) por agrupamiento que está colgante de la cadena principal.

#### **Ejemplos de composiciones con cadenas principales poliméricas derivadas de monómeros no biológicos**

**Ejemplo 33: Síntesis de 15PALPEG1035DTPA:** Se usará 15PALPEG1035DTPA como el material de partida para la síntesis de algunas de las composiciones de núcleo aniónico de la presente invención. Esta composición tiene clorhidrato de polialilamina (Sigma Chem. Co. St Luis Mo. Cat. N.º 283215, PM=15 kDa) como la cadena principal polimérica con 35 % de los grupos amino ocupados con MPEGC de 10 kDa (PM=10 kDa; SunBright; ME-100HS; lote N.º M62503; limpio en solución) y el grupo amino restante ocupado con ácido etilendiamintetraacético (DTPA). Para sintetizar 15PALPEG1035DTPA, tomar 1,0 g de clorhidrato de polialilamina (con 1 equivalente de grupo amino como se mide mediante TNBS) y disolver en 25 ml de tampón de HEPES 0,2 M a pH 7,4 (Pierce, Rockford, IL) para obtener una solución de 15 PAL. En un recipiente separado, disolver 0,35 equivalentes de MPEGAM (PM=10 kDa; MetoxiPEG con grupo carboxilo en el extremo, de Lysan bio; Arab, AL) en 60 ml de MES 20 mM a pH=4,7, añadir 0,5 equivalentes de NHS (PN=115,14), una vez disuelto añadir 1 equivalente de EDC (PM=191,71; 10,43 mmol) y agitar durante 20 minutos. Después de 20 minutos, añadir MPEGC activado directamente a la solución de 15PAL, después de 2 horas y medir los grupos amino mediante TNBS para asegurar si el 35 % de saturación de los grupos amino por otro lado añade más de la cantidad apropiada de MPEGC activado. Esta es la solución 15PALPEG1035. Realizar cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) con solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene elución de Acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con un diámetro molecular de aproximadamente 14-17 nm. Añadir 5 equivalentes de dianhídrido de DTPA (PM=357,32; Sigma Chem Co., St Louis, MO. Cat. N.º 284025) seguido de 200 µl de TEA. Valorar la reacción lentamente con NaOH 10 N hasta pH 7,8 y agitar durante 4 horas. Usando la reacción de TNBS, confirmar que no permanece ningún grupo amino indicativo de una reacción completa y que se ha preparado el producto de 15PALPEG1035DTPA. Realizar cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) con solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene elución de Acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con un diámetro molecular de 17-21 nm. Lavar el 15PALPEG1035DTPA resultante con 15 volúmenes de agua usando un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100.000 (UFP-100-E-5A; GE-Amersham) y liofilizar.

**Ejemplo 34: Síntesis de 15PALPEG1035DTPASO o 15PALPEG1035DTPASF o 15PALPEG1035DTPAPO:** Esta estructura comprende polialilamina de 15 kDa en la que el 35 % de los grupos amino están unidos covalentemente con MPEG de 10 kDa y los grupos amino restantes están unidos covalentemente con uno de los grupos carboxilo de ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA). El DTPA se modifica adicionalmente para contener cuatro grupos sulfato, cada uno unido con los grupos carbonilo de DTPA. Esencialmente, cada DTPA actúa como un espaciador para permitir que un agrupamiento de cuatro grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) se unan con la cadena principal de polialilamina (también pueden usarse otras cadenas principales). El 15PALPEG1035DTPA (véase anteriormente) puede convertirse en vehículo sulfatado (o sulfonatado o fosforilado) que contiene agrupamientos de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) con hasta cuatro grupos sulfato en cada agrupamiento. Para hacer esto, tomar 2 gramos del 15PALPEG1035DTPA y disolverlo en 50 ml de tampón de MES 10 mM (pH 4,7). Activar el vehículo añadiendo 0,28 g de NHSS (PM=217,14; 1,3 mmol), seguido de 0,56 g de EDC (PM=191,71; 2,9 mmol) y permitir que se active durante 20 minutos. En un recipiente separado disolver 0,37 g de 2-aminoetilhidrogenosulfato (AES; PM=141; 2,6 mmol) o 0,45 g de ácido sulfanílico (SNA; PM=173; 2,6 mmol) o

0,37 g de O-fosforiletanolamina (OPE; PM=141; 2,6 mmol) en 25 ml de tampón de HEPES 1 M (pH 7,3, ajustar el pH a 7,8 usando NaOH) y medir los grupos amino de partida mediante TNBS (Spadaro *et al.*, 1979, Anal. Chem., 96, p317-329) que deberían ser aproximadamente 2,6 mmol, dependiendo de la pureza de AES (o SNA u OPE). Añadir vehículo activado durante 20 minutos a la solución de AES (o SNA u OPE). Después de 2 horas añadir otros 0,56 g de EDC y agitar la solución durante una noche. Medir los grupos amino mediante TNBS para determinar la cantidad de reducción de grupos amino que es equivalente a la cantidad de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) incorporados. Lavar el vehículo sulfatado (o sulfonato o fosforilado) mediante 20 volúmenes de agua usando un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A; GE-Amersham), esterilizar por filtrado (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Este producto (15PALPEG1035DTPASO o 15PALPEG1035DTPASF o 15PALPEG1035DTPAPO) tendrá agrupamientos de hasta cuatro grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) por agrupamiento colgante de la cadena principal.

**Ejemplo 35: Síntesis de 20PMAPEG1035NTA:** El 20PMAPEG1035NTA se usará como el material de partida para la síntesis de algunas de las composiciones de núcleo aniónico de la presente invención. Esta composición tiene polimetilmetacrilato (Sigma Chem. Co. St Luis Mo. Cat. N.º 81498, PM=20 kDa) como la cadena principal polimérica con el 35 % de los grupos metoxi reemplazados con MPEGAM de 10 kDa (PM=10 kDa MPEG con grupo amino en el extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat. N.º P1AM-10) y los grupos metoxi restantes ocupados con ácido nitrilotriacético. Para preparar esta composición todos los grupos metoxi en polimetilmetacrilato (Sigma Chem. Co. St Luis Mo. Cat. N.º 81498, PM=20 kDa) se retirarán usando Metanólico/KOH para obtener ácido polimetilacrílico (PMA). En resumen, disolver 2 g de polimetilmetacrilato en 25 ml de KOH metanólico al 10 % y someter a reflujo durante 96 horas. Neutralizar con HCl y retirar metanol mediante evaporación rotatoria a 40 °C, disolver el sólido en agua y lavar con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 3 kDa (UFP-3-E-5A). Esterilizar por filtrado el producto resultante (PMA) usando (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar para obtener PMA. Medir el grupo carboxilo de partida (1 equivalente) en 1,0 g de PMA según el protocolo de Kobayashi y Chiba (Analytical biochemistry 1994, vol 219, p189-194). Para sintetizar 20PMAPEG1035NTA, tomar 1,0 g de PMA (con 1 equivalente de grupo carboxilo) y disolver en 25 ml de tampón de MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, Pierce, Rockford, IL) 10 mM a pH 4,7 (solución de PS) y activar añadiendo 1 equivalente de NHS (PM=115,14) y 1 equivalente de EDC (PM=191,71). En un recipiente separado, disolver 0,35 equivalentes de MPEGAM (PM=10 kDa MPEG con grupo amino en el extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat. N.º P1AM-10) en 10 ml de HEPES 0,2 M y ajustar el pH a 7,8 con NaOH 10 N. Después de 20 minutos de activación de PMA, añadir PMA a la solución de MPEGAM. Permitir que la reacción continúe durante 2 horas y medir el grupo amino restante del MPEGAM mediante TNBS y no debería haber ninguno lo que indica que se han consumido los 0,35 equivalentes del grupo amino y se han conjugado con el PMA. Si hay grupos amino restantes, ajustar el pH hasta 5 con HCl 6 N y añadir 1 equivalente de EDC (PM=191,71), después de 20 minutos ajustar de nuevo el pH a 7,8 y permitir que reaccione durante una noche. Tomar una alícuota de la solución de 20PMAPEG1035 resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene Acetonitrilo al 15 % como disolvente de elución a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con un diámetro de aproximadamente 13-18 nm. Ajustar el pH a 5 con HCl 6 N y añadir 1,5 equivalentes de EDC (PM=191,71) y activar durante 20 minutos. Después de 20 minutos añadir esta solución de 20PMAPEG1035 activada a 10 equivalentes de Nalfa,Nalfa-biscarboximetil-lisina (PM=262 Da) en hasta 25 ml de tampón de HEPES 1 M a pH 7,4 y permitir que reaccione durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción hasta 100 ml y lavar con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A). Esterilizar por filtrado el producto de 20PMAPEG1035NTA (usando filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Preparar una solución de 10 mg/ml de 20PMAPEG1035NTA resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato como disolvente de elución (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene Acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con un diámetro de aproximadamente 16-20 nm.

**Ejemplo 36: Síntesis de 20PMAPEG1035NTASO o 20PMAPEG1035NTASF o 20PMAPEG1035NTAPO:** Esta estructura comprende polimetilmetacrilato de 20 kDa en el que el 35 % de los grupos carboxilo están unidos covalentemente con MPEG de 10 kDa y los grupos carboxilo restantes están unidos covalentemente al grupo amino épsilon de biscarboximetil-lisina que es un derivado de ácido nitrilotriacético (NTA). El NTA está modificado adicionalmente para contener tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato), cada uno unido con los grupos carbonilo de NTA. Esencialmente, cada NTA actúa como un espaciador para permitir que un agrupamiento de tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) se una con la cadena principal de polimetilmetacrilato (también se pueden usar otras cadenas principales). El 20PMAPEG1035NTA (véase anteriormente) puede convertirse en vehículo sulfatado (o sulfonato o fosforilado) que contiene agrupamientos de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) con hasta tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) en cada agrupamiento. Para hacer esto, tomar 2 gramos del 20PMAPEG1035NTA y disolverlo en 50 ml de tampón de MES 10 mM (pH 4,7). Activar el vehículo añadiendo 0,28 g de NHSS (PM=217,14; 1,3 mmol), seguido de 0,56 g de EDC (PM=191,71; 2,9 mmol) y permitir que se active durante 20 minutos. En un recipiente separado disolver 0,37 g de 2-aminoetilhidrogenosulfato (AES; PM=141; 2,6 mmol) o 0,45 g de ácido sulfanílico (SNA; PM=173; 2,6 mmol) o 0,37 g de O-fosforiletanolamina (OPE; PM=141; 2,6 mmol) en 25 ml de tampón de HEPES 1 M (pH 7,3, ajustar el pH hasta 7,8 usando NaOH) y medir los grupos amino de partida mediante TNBS (Spadaro *et al.*, 1979, Anal. Chem., 96, p317-329) que debería ser aproximadamente 2,6 mmol, dependiendo de la pureza de AES (o SNA u OPE). Añadir vehículo activado

durante 20 minutos a la solución de AES (o SNA u OPE). Después de 2 horas añadir otros 0,56 g de EDC y agitar la solución durante una noche. Medir los grupos amino mediante TNBS para determinar la cantidad de reducción de grupos amino que es equivalente a la cantidad de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) incorporados. Lavar el vehículo sulfatado (o sulfonatado o fosforilado) mediante 20 volúmenes de agua usando un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A; GE-Amersham), esterilizar por filtrado (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Este producto (20PMAPEG1035NTASO o 20PMAPEG1035NTASF o 20PMAPEG1035NTAPO) tendrá agrupamientos de hasta tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) por agrupamiento colgante de la cadena principal.

**Ejemplo 37: Síntesis de 15PACPEG1035NTA:** El 15PACPEG1035NTA se usará como el material de partida para la síntesis de algunas de las composiciones de núcleo aniónico de la presente invención. Esta composición tiene ácido poliacrílico o PAC (Sigma Chem. Co. St Luis Mo. Cat. N.º 81123, PM=16 kDa) como la cadena principal polimérica con el 35 % de los grupos carboxi unidos a MPEGAM de 10 kDa (PM=10 kDa MPEG con grupo amino en el extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat. N.º P1AM-10) y los grupos carboxilo restantes ocupados con ácido nitrilotriacético. Medir el grupo carboxilo de partida (1 equivalente) en 1,0 g de PAC según el protocolo de Kobayashi y Chiba (Analytical biochemistry 1994, vol 219, p189-194). Para sintetizar 15PACPEG1035NTA, tomar 1,0 g de PAC (con 1 equivalente de grupo carboxilo) y disolver en 25 ml de tampón de MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, Pierce, Rockford, IL) 10 mM a pH 4,7 (solución de PAC). Añadir 1 equivalente de NHS (PM=115,14) y 1 equivalente de EDC (PM=191,71) a la solución de PAC agitándose al mismo tiempo para activar PAC. En un recipiente separado, disolver 0,35 equivalentes de MPEGAM (PM=10 kDa MPEG con grupo amino en el extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat. N.º P1AM-10) en 20 ml de HEPES 0,2 M y ajustar el pH a 7,8 usando NaOH para obtener MPEGAM. Después de activación durante 20 minutos de PAC, añadir la solución de PAC a la solución de MPEGAM. Permitir que la reacción continúe durante 2 horas y medir el grupo amino restante del MPEGAM mediante TNBS y no debería haber ninguno lo que indica que se han consumido los 0,35 equivalentes de grupo amino y se han conjugado con el PAC. Si hay grupos amino restantes en MPEGAM, ajustar el pH hasta 5 con HCl 6 N y añadir 1 equivalente de EDC (PM=191,71), después de 20 minutos ajustar de nuevo el pH a 7,8 y permitir que reaccione durante una noche para formar 15PACPEG1035. Tomar una alícuota de la solución de 15PACPEG1035 resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene Acetonitrilo al 15 % como disolvente de elución a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con un diámetro de aproximadamente 12-17 nm. Ajustar el pH hasta 5 con HCl 6 N y añadir 1,5 equivalentes de EDC (PM=191,71) y activar durante 20 minutos. Después de 20 minutos añadir esta solución de 15PACPEG1035 activada a 10 equivalentes de Nalfa,Nalfa-biscarboximetil-lisina (PM=262 Da) en hasta 25 ml de tampón de HEPES 1 M a pH 7,4 y permitir que reaccione durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción hasta 100 ml y lavar con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A). Esterilizar por filtrado el producto de 15PACPEG1035NTA (usando filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Preparar una solución de 10 mg/ml de 15PACPEG1035NTA resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato como disolvente de elución (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene Acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con un diámetro de aproximadamente 15-20 nm.

**Ejemplo 38: Síntesis de 15PACPEG1035NTASO o 15PACPEG1035NTASF o 15PACPEG1035NTAPO:** Esta estructura comprende ácido poliacrílico de 15 kDa en el que el 35 % de los grupos carboxilo están unidos covalentemente con MPEG de 10 kDa y los grupos carboxilo restantes están unidos covalentemente al grupo amino épsilon de biscarboximetil-lisina que es un derivado de ácido nitrilotriacético (NTA). El NTA se modifica adicionalmente para contener tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato), cada uno unido con los grupos carbonilo de NTA. Esencialmente, cada NTA actúa como un espaciador para permitir que un agrupamiento de tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato), se una con la cadena principal de ácido poliacrílico (también pueden usarse otras cadenas principales). El 15PACPEG1035NTA (véase anteriormente) puede convertirse en vehículo sulfatado (o sulfonatado o fosforilado) que contiene agrupamientos de grupos sulfato con hasta tres grupos sulfato en cada agrupamiento. Para hacer esto, tomar 2 gramos del 15PACPEG1035NTA y disolverlo en 50 ml de tampón de MES 10 mM (pH 4,7). Activar el vehículo añadiendo 0,28 g de NHSS (PM=217,14; 1,3 mmol), seguido de 0,56 g de EDC (PM=191,71; 2,9 mmol) y permitir que se active durante 20 minutos. En un recipiente separado disolver 0,37 g de 2-aminoetilhidrogenosulfato (AES; PM=141; 2,6 mmol) o 0,45 g de ácido sulfanílico (SNA; PM=173; 2,6 mmol) o 0,37 g de O-fosforiletanolamina (OPE; PM=141; 2,6 mmol) en 25 ml de tampón de HEPES 1 M (pH 7,3, ajustar el pH a 7,8 usando NaOH) y medir los grupos amino de partida mediante TNBS (Spadaro *et al.*, 1979, Anal. Chem., 96, p317-329) lo que debería ser aproximadamente 2,6 mmol, dependiendo de la pureza de AES (o SNA u OPE). Añadir vehículo activado durante 20 minutos a la solución de AES (o SNA u OPE). Después de 2 horas añadir otros 0,56 g de EDC y agitar la solución durante una noche. Medir los grupos amino mediante TNBS para determinar la cantidad de reducción de grupos amino que es equivalente a la cantidad de grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) incorporados. Lavar el vehículo sulfatado (o sulfonatado o fosforilado) mediante 20 volúmenes de agua usando un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A; GE-Amersham), esterilizar por filtrado (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar. Este producto (15PACPEG1035NTASO o 15PACPEG1035NTASF o 15PACPEG1035NTAPO) tendrá agrupamientos de hasta tres grupos sulfato (o sulfonato o fosfato) por agrupamiento colgante de la cadena principal.

**Uso de cadenas principales poliméricas sin grupos funcionales modificables específicos.**

**Ejemplo 39: Uso de poliglicina, polialanina, polivalina, fenilalanina, polioxietilenglicol, polioxipropilenglicol y similares (designados en este ejemplo INRT como grupo) como una cadena principal polimérica es posible mediante el uso de reticulantes heterobifuncionales fotorreactivos inespecíficos que pueden introducir grupos funcionales carboxilo en todos estos polímeros.** Los ejemplos de reticuladores heterobifuncionales

fotorreactivos incluyen NHS-diazirina (succinimidil 4,4'-azipentanoato), NHS-LC-diazirina (succinimidil 6-(4,4'-azipentanamido)hexanoato), NHS-SS-diazirina (succinimidil 2-([4,4'-azipentanamido]etil)-1,3'-ditiopropionato, Sulfo-NHS-diazirina (sulfosuccinimidil 4,4'-azipentanoato), Sulfo-NHS-LC-diazirina (sulfosuccinimidil 6-(4,4'-azipentanamido)hexanoato), Sulfo-NHS-SS-diazirina (sulfosuccinimidil 2-([4,4'-azipentanamido]etil)-1,3'-ditiopropionato), ANB-NOS (N-5-Azido-2-nitrobenzoiloxisuccinimida), NHS-ASA (ácido N-Hidroxisuccinimidil-4-azidosalicílico), SADP (N-Succinimidil(4-azidofenil)-1,3'-ditiopropionato), Sulfo-SAND (Sulfosuccinimidil-2-(m-azido-o-nitrobenzamido)-etil-1,3'-propionato), SANPAH (N-Succinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino) hexanoato), Sulfo-HSAB (N-Hidroxisulfosuccinimidil-4-azidobenzoato), Sulfo-NHS-LC-ASA (Sulfosuccinimidil[4-azidosalicilamido]-hexanoato), Sulfo-SADP (N-Sulfosuccinimidil(4-azidofenil)-1,3'-ditiopropionato), Sulfo-SAED (Sulfosuccinimidil 2-[7-amino-4-metilcoumarin-3-acetamido]etil-1,3'-ditiopropionato), Sulfo-SANPAH (N-Sulfosuccinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino) hexanoato), Sulfo-SBED (Sulfo-N-hidroxisuccinimidil-2-(6-[biotinamido]-2-(p-azidobenzamido)-hexanoamido)etil-1,3'-ditiopropionato) y Sulfo-SFAD (Sulfosuccinimidil-(perfluoroazidobenzamido)-etil-1,3'-ditiopropionato). Todos estos reactivos están disponibles en el mercado de Pierce, Rockford, IL. Son reactivos fotorreactivos los reactivos químicamente inertes que se hacen reactivos cuando se exponen a luz ultravioleta o visible. Los grupos fotorreactivos tradicionales en estos reactivos son aril azidas. Cuando una aril azida se expone a luz UV, forma un grupo nitreno que puede iniciar reacciones de adición con dobles enlaces, inserción en C-H en ausencia de sitios N-H (por ejemplo, aminas primarias), lo que sucede para polímeros de INRT. La reacción con la ruta de NH domina cuando están presentes aminas primarias en la muestra y deben evitarse. Deben evitarse agentes reductores que contienen tiol (por ejemplo, DTT o 2-mercaptoetanol) en la solución de muestra durante todas las etapas antes y durante la fotoactivación. Estos reactivos reducirán la azida. Los reactivos de succinimidil-éster diazirina (SDA) son una nueva clase de reticuladores que combinan química sensible a amina demostrada con una fotoquímica basada en diazirina eficaz para fotorreticulación con casi cualquier otro grupo funcional. Los fotorreticuladores basados en diazirina tienen mejor fotoestabilidad que fotorreticuladores basados en fenil azida y se activan fácilmente con luz UV de onda larga (330-370 nm). En el ejemplo de síntesis a continuación, INRT designará un polímero que no tiene grupos modificables fácilmente.

**Ejemplo 40: Síntesis de 20INRTPEGG1035NTA:** Esta composición tiene INRT como la cadena principal polimérica con 35 % de los grupos carboxilo fotoinducidos unidos a MPEGAM de 10 kDa (PM=10 kDa MPEGAM tiene grupo amino en el extremo, Sunbio, Orinda, CA; Cat. N.º P1AM-10) y los grupos carboxilo restantes ocupados con ácido nitrilotriacético. Como se ha descrito anteriormente, una vez que se ha introducido NTA en el polímero, la adición de sulfato, sulfonato y fosfato es sencilla (véase anteriormente). Una vez que se han introducido sulfato, sulfonato y fosfato, la función quelante de NTA se reduce significativamente o se elimina. Para introducir grupos carboxilo en el polímero de INRT, disolver 2 g de INRT (20 kDa) en 50-100 ml de disolvente apropiado, añadir 20-40 mmol de Sulfo-NHS-diazirina y exponer la solución a luz UV (330-370 nm) durante 2-10 minutos. Ajustar el pH hasta 9 y dejar a temperatura ambiente durante 2 horas para escindir el NHS y exponer los grupos carboxilo para su análisis y ensayo de control de calidad. Lavar el producto modificado con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 3 kDa (UFP-3-E-5A). Esterilizar por filtrado el producto carboxilado resultante (20INRT) usando (filtro de polisulfona de 0,2 µm, Nalgene, Rochester, NY) y liofilizar para obtener 20INRT. Antes de usar 20INRT para la síntesis de 20INRTPEGG1035NTA, medir el grupo carboxilo de partida (1 equivalente) en 1,0 g de 20INRT según el protocolo de Kobayashi y Chiba (Analytical biochemistry 1994, vol 219, p189-194). Si hay menos de 1 mmol de carboxilo en 1 gramo de 20INRT, introducir más carboxilo repitiendo el proceso anterior. Para sintetizar 20INRTPEGG1035NTA, tomar 1,0 g de INRT (con 1 equivalente de grupo carboxilo) y disolver en 50 ml de tampón de MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, Pierce, Rockford, IL) 10 mM a pH 4,7 para obtener solución de INRT. A la solución de INRTPEG, añadir 1 equivalente de NHS (PM=115,14) y 1 equivalente de solución de EDC (PM=191,71) agitando al mismo tiempo para permitir que se active durante 20 minutos. En un recipiente separado disolver 0,35 equivalentes de MPEGAM (PM=10 kDa MPEG con grupo amino en el extremo; Sunbio, Orinda, CA; Cat. N.º P1AM-10) en 20 ml de HEPES 0,2 M y ajustar el pH a 7,8 usando NaOH. Después de activación de 20 minutos de INRT, añadir a la solución de INRT para preparar la solución de INRTPEG. Permitir que la reacción continúe durante 2 horas y medir los grupos amino restante del MPEGAM mediante TNBS y no debería haber ninguno lo que indica que se han consumido los 0,35 equivalentes de grupos aminos y se han conjugado con el INRT. Si hay grupos amino restantes en MPEGAM, ajustar el pH a 5 con HCl 6 N y añadir 1 equivalente de EDC (PM=191,71), después de 20 minutos ajustar de nuevo el pH a 7,8 y permitir que reaccione durante una noche para formar 20INRTPEGG1035. Tomar una alícuota de la solución de 20INRTPEGG1035 resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene Acetonitrilo al 15 % como disolvente de elución a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con un diámetro de aproximadamente 12-17 nm. Ajustar el pH hasta 5 con HCl 6 N y añadir 1,5 equivalentes de EDC (PM=191,71) y activar durante 20 minutos. Después de 20 minutos añadir esta solución de 20INRTPEGG1035 activada a 10 equivalentes de Nalfa,Nalfa-biscarboximetil-lisina (PM=262 Da) en hasta 25 ml de tampón de HEPES 1 M a pH 7,4 y permitir que reaccione durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción hasta 100 ml y lavar con 15 cambios de agua en un cartucho de ultrafiltración de PCPM de 100 kDa (UFP-100-E-5A). Esterilizar por filtrado el producto

de 20INRTPEGG1035NTA (usando filtro de polisulfona de 0,2  $\mu$ m, Nalgene, Rochester, NI) y liofilizar. Preparar una solución de 10 mg/ml de 20INRTPEGG1035NTA resultante y determinar el diámetro hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando columna TosohG4000WXL (0,79 x 30 cm) y solución salina tamponada con fosfato como disolvente de elución (PBS; fosfato 11,9 mM, NaCl 137 mM, KPO<sub>4</sub> 2,7 mM, pH 7,4) que contiene Acetonitrilo al 15 % a un caudal de 0,6 ml/min. El tiempo de retención debería ser coherente con un diámetro de aproximadamente 16-22 nm.

**Ejemplo 41: Distinción entre interacción aniónica e interacción de enlace metálico:** Se realizaron estudios de unión con 50 % de carga (donde la cantidad de molécula en peso es del 50 % del peso del vehículo usado) en siete vehículos diferentes en presencia y ausencia de concentración salina alta. La interacción aniónica puede desplazarse mediante concentración alta de NaCl (0,4 M) mientras que la interacción de enlace metálico no puede desplazarse fácilmente con alta concentración de NaCl. Los siguientes vehículos se ensayaron en este estudio: CSPEG104G, HPPEG105G, 20PLPEG1030DTPA, 20PLPEG1030DTPASO, 20PLPEG1030DTPASF y 20PLPEG1030DTPAPO. El 20PLPEG570DANTA-Zn es un vehículo que tiene cadena principal de polilisina de 20 kDa en la que el 70 % de los grupos amino se derivatizaron con MPEG de 5 kDa y los grupos amino restantes se derivatizaron con ácido nitrilotriacético usando bicarboximetil lisina. En este caso se usó ácido succínico como un espaciador entre un grupo amino épsilon de lisina y bicarboximetil lisina. El producto resultante (20PLPEG570DANTA-Zn) se saturó después con ion de cinc y se usó para la demostración de interacción por enlace metálico. En el estudio de unión posterior, no se usó ningún metal en este experimento excepto el control con Lisostafina 6xHis como un control positivo de enlace metálico. Para este estudio se cargaron 0,25 mg de vehículo en 250  $\mu$ l de solución (HEPES 10 mM/NaCl 400 mM o HEPES 10 mM solamente) con Lisostafina (50 % del peso del vehículo (0,125 mg)) y se incubó durante dos horas a TA. Se realizó análisis por triplicado. Todas las soluciones se centrifugaron a 13000 rpm durante 12 minutos (microcentrífuga Eppendorf) para descartar la posibilidad de que el sedimento de precipitación pueda interferir con el análisis. Los sobrenadante se filtraron usando una membrana de PCPM de 100 kDa (celulosa) a 13000 rpm durante 12 minutos para eliminar el complejo de vehículo-peptido (unido). El filtrado (que contiene Lisostafina libre) se analizó (resultados mostrados en la Tabla 2 posterior) mediante ensayo de TNBS. [Ensayo de TNBS: Se preparó una solución de TNBS añadiendo 30  $\mu$ l de solución de ácido Picrilsulfónico 1 M (Fluka Cat. N.º 92823) en 12 ml de tetraborato de sodio 0,1 M a pH 9,2. En la placa de 96 pocillos transparente, se añadieron 150  $\mu$ l de filtrados y patrones para asignar el pocillo. Se añadieron 100  $\mu$ l de solución de TNBS a los pocillos (volumen final de 250  $\mu$ l). La placa se incubó durante 30 minutos y la absorbancia a 420 nm se midió mediante BioScan]. La Tabla 2 a continuación muestra que la interacción de lisostafina con la composición de la presente invención es mediante interacción aniónica y no mediante interacción de enlaces metálicos. Para control positivo, se muestra (última columna) que la lisostafina 6-his interacciona con vehículo de control que contiene cinc (un ion metálico multivalente necesario para formar el enlace metálico) mediante interacción de iones metálicos como se demuestra a partir de la incapacidad de NaCl 0,4 M para desplazar lisostafina 6-his del vehículo. La segunda fila en la tabla 2 es el tipo de lisostafina cargada en el vehículo aniónico. La tercera fila en la tabla 2 es el porcentaje de lisostafina total que no se unió con el vehículo cuando hay NaCl 0,4 M en la mezcla de incubación (obsérvese que los iones sodio y potasio no son multivalentes y no forman complejo de multi-coordinación). La cuarta fila en la tabla 2 es el porcentaje de lisostafina total que no se unió con el vehículo cuando no hubo ningún NaCl en la mezcla de incubación. Obsérvese que la unión de liso 6-His es resistente a NaCl 0,4 M (un control positivo de enlace metálico). En presencia de iones metálicos multivalentes (no mostrados en el presente documento), es muy sorprendente que la unión de lisostafina nativa con la composición de núcleo aniónico de la presente invención sigue siendo sensible a NaCl 0,4 M lo que indica que no se produce ningún enlace metálico.



**Tabla 2: Muestra el porcentaje de la isostafina total cargada en el vehículo que no se unió con el vehículo (isostafina no unida libre).**

Vehículo	CSPEG104G Sin metal	HPPEG105G Sin metal	20PLPEG10 30DTPA Sin metal	20PLPEG10 30DTPASO Sin metal	20PLPEG10 30DTPASF Sin metal	20PLPEG103 0DTPAPO Sin metal	20PLPEG570 DANTA-Zn
Lisostafina cargada	Liso nativa	Liso nativa	Liso nativa	Liso nativa	Liso nativa	Liso nativa	Liso 6-His
Cargar al 50 % con NaCl 0,4 M	98,2 % libre	96,3 % libre	98,4 % libre	93,9 % libre	76 % libre	92,7 % libre	4,6 % libre
Cargar al 50 % sin NaCl	12,1 % libre	6,8 % libre	8,1 % libre	7,1 % libre	5,1 % libre	8,7 % libre	2,1 % libre

**Ejemplo 42: Determinación de  $K_D$  de la interacción entre Lisostafina y composición de vehículo de núcleo aniónico de la presente invención:** Se determinaron las constantes de disociación ( $K_D$ ) entre Lisostafina y diversos vehículos. Las  $K_D$  de lisostafina se midieron con los siguientes vehículos en ausencia de iones metálicos multivalentes: CSPEG104G, HPPEG104G, 20PLPEG1030DTPA, 20PLPEG1030DTPASO, 20PLPEG1030DTPASF y 20PLPEG1030DTPAPO. El lote N.º 20090508 se cargó con 25 %-150 % de Lisostafina (en comparación con el peso de vehículo) para medir la  $K_D$ . CSPEG104G se cargó con 150 %-500 % de Lisostafina. Las muestras de los vehículos enumerados anteriormente se cargaron con 50 %-250 % de Lisostafina para medir la  $K_D$ . La lisostafina unida y libre se separaron como en el Ejemplo 44 anterior. Todas las muestras se midieron mediante ensayo de TNBS para determinar libre y unida como se ha descrito anteriormente. Con información de libre y unida, se construyeron diagramas de Scatchard (el eje y es unida/libre y el eje x es unida). A partir de los diagramas de Scatchard, se calcularon la  $K_D$  y la capacidad del vehículo (la pendiente es  $-1/K_D$  y la abscisa en el origen es la capacidad) y se resumen en la Tabla 3. Esto muestra que hay interacción directa entre la lisostafina (proteína con punto isoelectrico básico de 9,56) y la composición de núcleo aniónico de la presente invención. No estuvieron presentes iones metálicos multivalentes intermediarios en la mezcla y aun así se observó una  $K_D$  en el intervalo nanomolar. Además, la interacción fue sensible a alta concentración de NaCl lo que indica interacción iónica y no enlace de coordinación.

**Tabla 3: Todos los vehículos de núcleo aniónico se unen con lisostafina siendo el agente de unión más eficaz el de polisacárido muy sulfatado (heparina).**

Vehículo	CSPEG104G	HPPEG104G	20PLPEG1030-DTPA	20PLPEG1030-DTPASO	20PLPEG1030-DTPASF	20PLPEG1030-DTPAPO
Capacidad	6 sitios	7 sitios	5 sitios	13 sitios	6 sitios	12 sitios
Kd	515 nM	96 nM	240 nM	290 nM	131 nM	606 nM

**Ejemplo 43: Estudio de PK de lisostafina:** Se seleccionaron cuatro vehículos para estudio de PK. CSPEG106G, HPPEG105G, 20PLPEG1030-DTPA y 20PLPEG1030-DTPA-SO se cargaron con Lisostafina equivalente a 50 % del peso del vehículo. Estas formulaciones se obtuvieron disolviendo juntas una cantidad apropiada de vehículo y Lisostafina en agua e incubando durante dos horas seguido de liofilización. Cada formulación liofilizada (incluyendo lisostafina no formulada sola) se disolvió en solución salina y se administró a ratas Sprague Dawley (n=4) mediante embolada i.v. lenta (al menos 1 min) (12 mg de lisostafina/kg) a través de la vena de la cola lateral. Se tomaron muestras de sangre del seno orbital a 5 m, 15 m, 30 m, 60 m, 120 m, 4 h, 6 h, 24 h, 32 h (30 h) y 48 h y se colocaron en tubos que contenían Inhibidores de proteasa (AEBSF, Aprotinina, E-64, EDTA y Leupeptina). Se obtuvieron sueros por centrifugación a 13.000 rpm. Todos los sueros se almacenaron a -80 °C hasta que se usaron en el ensayo. Se usaron 10 µl de suero en este ensayo para cada punto temporal. La actividad de lisostafina se midió mediante ensayo de actividad de la siguiente manera: Se preparó tampón de reserva (10X) para que contuviera MOPS 1 M/Tween 10 % (en peso)/EDTA 5 mM/pH 7,3. Las mezclas de reacción finales (200 µl) en placa de 96 pocillos negra se prepararon para contener 5 µg de sustrato, MOPS 100 mM, Tween20 1 %, EDTA 0,5 mM, pH 7,3 y 10 µl de muestras de suero. Las muestras se añadieron al final y después de la adición los pocillos se mezclaron y se retiraron las burbujas en la solución usando una punta de pipeta húmeda con etanol. El aumento de fluorescencia (Ex 485 nm/Em 535 nm) se supervisó durante dos horas usando fluorímetro de microplacas de 96 pocillos Chameleon (Bioscan) cada 7,5 minutos durante 2 horas. El sustrato proporcionó un producto fluorescente cuando fue escindido de forma proteolítica por lisostafina.

**Tabla 4: Muestra el perfil de PK de lisostafina formulada con diversas composiciones de núcleo aniónico de la presente invención.**

Vehículo	CSPEG106G	HPPEG105G	20PLPEG1030-DTPA	20PLPEG1030-DTPA-SO	Lisostafina sin vehículo
C <sub>0</sub> , µg/ml	342	324	257	765	301
ABC <sub>0</sub> hasta el final, h (µg/ml)	181	120	66,9	96,6	64,2
ABC <sub>0</sub> hasta ∞, h (µg/ml)	185	124	68,7	97,9	67
t <sub>1/2</sub> terminal, h	8,44	6,13	0,713	0,343	1,53
Tiempo de residencia medio, h	5,07	7,91	1,77	2,11	0,984

**Ejemplo 44: Unión de diversos péptidos terapéuticos con composición de núcleo aniónico de la presente invención:** Péptidos antiinflamatorios (SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 31) que actúan de forma intracelular y contienen restos de aminoácidos básicos que les permiten penetrar en la membrana. La misma propiedad que les permite penetrar en la membrana les permite unirse al vehículo de la presente invención. Se realizaron estudios de unión con estos péptidos para cinco vehículos de núcleo aniónico diferentes de la presente invención. Se ensayaron los siguientes vehículos sin metales en este estudio: CSPEG104G, HPPEG105G, 20PLPEG1030DTPA, 20PLPEG1030DTPASO, 20PLPEG1030DTPASF y 20PLPEG1030DTPAPO. Para este estudio se cargaron con péptidos (0,02 mg) 0,1 mg (para 20 % de carga) o 1 mg (para 2 % de carga) de cada vehículo en 250 µl de solución (HEPES 100 mM/NaCl 100 mM) y se incubaron durante dos horas en TA. Se realizó análisis por duplicado. Todas las soluciones se centrifugaron a 13000 rpm durante 12 minutos para descartar la posibilidad de sedimentación de precipitación que puede interferir con el análisis. El sobrenadante se filtró usando una membrana de PCPM de 100 kDa (celulosa) a 13000 rpm durante 12 minutos para eliminar el complejo de vehículo-péptido (unido). El filtrado (péptidos libres) se analizó mediante ensayo de HPLC. La tabla 5 a continuación muestra que la heparina con PEG fue el mejor vehículo para la mayoría de los péptidos pero puede usarse cualquier vehículo aniónico para el péptido de SEQ ID NO: 2.

**Tabla 5: Muestra el porcentaje de péptidos que no se unieron con el vehículo (libre) con los péptidos restantes unidos al vehículo**

SEQ ID	Vehículo, Lote N,°	HPPEG105	20PLPEG10	20PLPEG10	20PLPEG10	20PLPEG10	20PLPEG10
NO/Nombre	% de carga	G	30 DTPA	30 DTPASO	30 DTPASF	30 DTPAPO	
2 / NBD	20 % de carga	0 % libre	0 % libre	0 % libre	0 % libre	0 % libre	0 % libre
7 / P65	20 % de carga	5,6 % libre	100 % libre	100 % libre	100 % libre	86,7 % libre	
7 / P65	2 % de carga	0 % libre	50 % libre	50 % libre	52,4 % libre	14,6 % libre	
31 / PR39	20 % de carga	0,4 % libre	N/D	87,5 % libre	100 % libre	86,9 % libre	
31 / PR39	2 % de carga	0,5 % libre	N/D	35,6 % libre	42,8 % libre	26,4 % libre	

**Ejemplo 45: Determinación de Kd de la interacción entre SEQ ID NO: 2 y composición de vehículo de núcleo aniónico de la presente invención:** SEQ ID NO: 2 es el Péptido Inhibidor del Dominio de Unión a NEMO (NBD) IKKY que es útil en diversas enfermedades inflamatorias ya que inhibe la activación de NFkB. Se determinaron las constantes de disociación (Kd) entre NBD y diversos vehículos. Se midieron las Kd de NBD con los siguientes vehículos, en ausencia de iones metálicos multivalentes: HPPEG105G, 20PLPEG1030-DTPASO y 20PLPEG1030DTPAPO. HPPEG105G y 20PLPEG1030DTPAPO se cargaron con 100 %-300 % de NBD para medir Kd. 20PLPEG1030-DTPASO se cargó con 50 %-150 % de NBD. Todos los NBD sin unir se midieron mediante HPLC como anteriormente. Con información de libre y unido, se construyeron diagramas de Scatchard (el eje y es unido/libre y el eje x es unido). A partir de los diagramas de Scatchard, se calcularon la Kd y la capacidad del vehículo (la pendiente es  $-1/Kd$  y la abscisa en el origen es la capacidad) y los resultados se resumen en la Tabla 6.

**Tabla 6: Muestra las Kd y capacidades de diversos vehículos para NBD.**

Vehículo	HPPEG105G	20PLPEG1030DTPASO	20PLPEG1030DTPAPO
Lote N.º	20090825	20090831b	20090902
Capacidad	32 sitios	72 sitios	112 sitios
Kd	925 nM	2,4 µM	1,5 µM

**Ejemplo 46: Unión de factor de crecimiento epidérmico (EGF) de unión a heparina (HB) con el vehículo de la presente invención.** El HB-EGF es un factor de crecimiento relacionado con el factor de crecimiento epidérmico EGF que señala a través del receptor de EGF y estimula la proliferación de células de músculo liso (SMC), fibroblastos, células epiteliales y queratinocitos. El HB-EGF se expresa en numerosos tipos celulares y tejidos, incluyendo células endoteliales vasculares y SMC, macrófagos, músculo esquelético, queratinocitos y determinadas células tumorales. La capacidad del HB-EGF para unirse específicamente con heparina y proteoglicanos de sulfato de heparina es distinta de otras moléculas de tipo EGF y puede estar relacionada con la actividad mitógena potenciada, en relación con EGF, que HB-EGF ejerce sobre células de músculo liso. El gen de HB-EGF humano codifica una proteína transmembrana de 208 aminoácidos, que puede escindirse proteolíticamente para producir HB-EGF soluble. El factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ) es un factor de crecimiento polipeptídico relacionado con EGF que señala a través del receptor de EGF y estimula la proliferación de una amplia variedad de células epidérmicas y epiteliales. Es producido por monocitos, queratinocitos y diversas células tumorales. TGF- $\alpha$  induce independencia de anclaje de transformación de células cultivadas. TGF- $\alpha$  humano, murino y de rata son reactivos entre especies. El TGF- $\alpha$  humano recombinante es un polipéptido de 50 aminoácidos (5,5 kDa) que comparte aproximadamente 40 % de homología de secuencia con EGF, incluyendo 6 restos de cisteína conservados, que forman 3 enlaces disulfuro intramoleculares. La betacelulina y la anfirregulina son ambos miembros de la familia de EGF. Otra familia de factor de crecimiento cuyos miembros serán moléculas de carga ideales para las composiciones de vehículo de la presente invención es la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) que se sabe en la técnica que tiene más de una docena de miembros. Se pretende que estos factores de crecimiento se carguen en la composición de la presente invención no debido a que tengan un punto isoeléctrico por encima de 7 sino más bien a que tienen sitios de unión aniónicos en su estructura capaces de unirse con carboxilato, sulfato, sulfonato o fosfato. La Tabla 5 a continuación muestra la unión de EGF con los vehículos de la presente invención. Para este estudio se cargaron 2 mg de cada vehículo en 250 µl de solución (HEPES 100 mM/NaCl 100 mM) con EGF (0,01 mg) y se incubaron durante dos horas en TA. Se realizaron análisis por duplicado. Todas las soluciones se centrifugaron a 13000 rpm durante 12 minutos para descartar la posibilidad de que el sedimento de precipitación pueda interferir con el análisis. No se observó precipitación. El sobrenadante se filtró usando membrana de PCPM de 100 kDa (celulosa) a 13000 rpm durante 12 minutos para eliminar el complejo de vehículo-péptido (unido). El filtrado (EGF libre) se analizó mediante ensayo de Elisa (R&D systems; Minneapolis, MN). La tabla 5 a continuación muestra la unión de EGF con los vehículos de la presente invención.

**Tabla 5: Muestra el porcentaje de EGF total que no se unió con el vehículo (libre) con el EGF restante unido al vehículo.**

Vehículo	HPPEG52G	HPPEG104G	CSPEG104G	CSPEG52G
EGF a 0,5 % de carga	13 % libre	13,6 % libre	0 % libre	0 % libre

**Ejemplo 47: La molécula de carga (proteína o péptido) con punto isoeléctrico (pI) por encima de 7,3 se beneficia de la protección del vehículo en la sangre.** Cuando la molécula de carga se mezcla con el vehículo de la presente invención y se inyecta en animales, el tiempo de circulación en sangre de la molécula de carga con punto isoeléctrico por debajo de 7,3 no está extendido en comparación con el control sin formular (Tabla 7). Sin embargo, cuando una molécula de carga se mezcla con el vehículo de la presente invención y se inyecta en animales el tiempo de circulación en sangre para una molécula de carga con punto isoeléctrico por encima de 7,3 está extendido en comparación con el control sin formular (Tabla 7). En una realización, la molécula de carga debe tener un pI por encima de 7,3 para beneficiarse del vehículo de la presente invención.

**Tabla 7: Esta muestra la extensión del tiempo de circulación en sangre *in vivo* de la molécula de carga básica ( $pI > 7,3$ ) en combinación con el vehículo de la presente invención.**

PGC	Moléculas de carga de péptidos o proteínas	Punto isoeléctrico	Nivel de péptido/proteína en sangre promedio <i>in vivo</i> (tiempo de toma de muestras)		Especie de roedor, n.º de animales ensayados (dosis proporcionada)
HPPEG105G	GLP1	5,4	N.D.* (24 h)	N.D.* (48 h)	Ratones Balb/c, n=3 (1 mg/kg)
----	GLP1	5,4	N.D.* (24 h)	N.D.* (48 h)	Ratones Balb/c, n=3 (1 mg/kg)
CSPEG106G	Lisostafina	9,56	1000 ng/ml (24 h)	420 ng/ml (48 h)	Ratas Sprague Dawley, n=5 (10 mg/kg)
-----	Lisostafina	9,56	N,D,* (24 h)	N.D.* (48 h)	Ratas Sprague Dawley, n=5 (10 mg/kg)
CSPEG52G	EGF de union a heparina	8,56	3.700 pg/ml (6 h)	40 pg/ml (24 h)	Ratones Balb/c, n=3 (300 µg/kg)
-----	EGF de union a heparina	8,56	N.D.* (6 h)	N.D.* (24 h)	Ratones Balb/c, n=3 (300 µg/kg)
HPPEG52G	PR39	9,96	840 ng/ml (24 h)	310 ng/ml (48 h)	Ratas Sprague Dawley, n=5 (10 mg/kg)
-----	PR39	<b>9,96</b>	370 ng/ml (24 h)	30 ng/ml (48 h)	Ratas Sprague Dawley, n=5 (10 mg/kg)

\*N.D. Indica que el nivel no está detectado o está al nivel de fondo. Todas las señales de fondo se restaron de las lecturas. Los ensayos usados para GLP1 y EGF de unión a heparina son kits de ensayo de Elisa de Millipore (Bedford, MA) y R&D systems (Mineápolis, MN), respectivamente y se usaron según las instrucciones del fabricante. El ensayo usado para lisostafina es un ensayo de FRET que aumenta la fluorescencia cuando se degrada por lisostafina y la solución de ensayo se supervisó usando lector de microplacas de fluorescencia (Molecular Devices, CA). El ensayo usado para PR39 es lectura de fluorescencia directa de PR39 marcado con Fluoresceína.

- 5 La vasculatura sanguínea de mamífero está revestida de cargas aniónicas (proteoglicanos) y los sustituyentes sanguíneos (proteínas y células) son todos aniónicos. Otros componentes neutros tales como triglicéridos están empaquetados en lipoproteínas con carga negativa. Es sorprendente e inesperado que la integridad de interacción iónica entre el vehículo aniónico y la molécula de carga catiónica (molécula de carga básica) se mantiene en la sangre. La sangre tiene osmolalidad de 280 mOsmol o sal aproximadamente 150 mM que puede alterar la interacción iónica. Además, la sangre contiene proteínas aniónicas y células que son aniónicas y puede competir y unirse con moléculas de carga y alejarlas de los vehículos aniónicos de la presente invención. Las paredes de los vasos sanguíneos aniónicas también pueden retirar las moléculas de carga del vehículo. No obstante los resultados anteriores indican que estas fuerzas fisiológicas no superan las interacciones iónicas entre las moléculas de carga y el vehículo aniónico de la presente invención.
- 10
- 15 Aunque se han mostrado y descrito en el presente documento realizaciones preferidas de la presente invención, resultará evidente para los expertos en la materia que dichas realizaciones se proporcionan solamente como ejemplo. Debería entenderse que pueden emplearse diversas alternativas a las realizaciones de la invención descritas en el presente documento en la práctica de la invención. Debería observarse que para el fin de mayor claridad del alcance de la invención, las composiciones de la presente invención se describen en bloques tales como cadena principal polimérica, cadenas protectoras, grupos aniónicos y moléculas de carga. No se pretende que cada bloque sea un componente inherente del otro. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la cadena principal comprende grupos carboxilo para formar amida que mantiene la cadena principal intacta. Dichos grupos carboxilo no son los mismos grupos carboxilo que componen los otros bloques tales como los grupos aniónicos (es decir no debería usarse ningún argumento circular en la interpretación de las reivindicaciones). En determinadas realizaciones, para el fin de la presente memoria descriptiva se interpretará que los polímeros que contienen de forma natural grupos aniónicos (carboxilo, sulfato, sulfonato o fosfato) contienen tanto la cadena principal (primer bloque) como el grupo aniónico (segundo bloque) de la composición de la presente invención. En otras realizaciones, las composiciones previstas con grupos aniónicos son distintas de cualquier grupo aniónico que pueda estar presente en la cadena principal polimérica. Los bloques que componen una composición particular se asocian entre sí de una manera definida y cada bloque no debería solapar entre sí en la interpretación de las reivindicaciones.
- 20
- 25
- 30

#### LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> PHARMAIN CORPORATION
- <120> COMPOSICIÓN DE NÚCLEO ANIÓNICO PARA SUMINISTRO DE AGENTES TERAPÉUTICOS Y MÉTODOS DE PREPARACIÓN Y USO DE LA MISMA
- <130> N116377

ES 2 734 884 T3

<140> EP10816024.3  
<141> 08-09-2010

5 <150> 61/240.857  
<151> 09-09-2009

<150> 61/241.004  
<151> 09-09-2009

10 <160> 73

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 1

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Gly Thr Ala Leu Asp Trp Ser  
1 5 10 15

Trp Leu Gln Thr Glu  
20

25 <210> 2  
<211> 28  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

35 <400> 2

Asp Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys  
1 5 10 15

Lys Thr Ala Leu Asp Trp Ser Trp Leu Gln Thr Glu  
20 25

40 <210> 3  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 3

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Thr Ala Leu Asp Trp Ser  
1 5 10 15

Trp Leu Gln Thr Glu  
20

50



<210> 4  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
 <400> 4  
 10  
     Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Thr Thr Leu Asp  
     1                  5                  10                  15  
     Trp Ser Trp Leu Gln Met Glu  
                   20  
 <210> 5  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
 20  
 <400> 5  
     Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Arg Pro Lys Arg Pro  
     1                  5                  10                  15  
     Thr Thr Leu Asn Leu Phe  
                   20  
 25  
 <210> 6  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
 <400> 6  
     Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe  
     1                  5                  10                  15  
 35  
 <210> 7  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
 45  
 <400> 7  
     Asp Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys  
     1                  5                  10                  15  
     Lys Gln Leu Arg Arg Pro Ser Asp Arg Glu Leu Ser Glu  
                   20                  25  
 50  
 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> PRT

ES 2 734 884 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5

<400> 8

```

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gln Leu Arg Arg Pro Ser Asp Arg
1           5           10           15

Glu Leu Ser Glu
                20
    
```

10

<210> 9

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 9

```

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Val Gln Arg Lys Arg Gln Lys Leu
1           5           10           15
    
```

20

```

Met Pro
    
```

<210> 10

<211> 22

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

30

<400> 10

```

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Asp Asp Arg His Asp Ser Gly Leu
1           5           10           15
    
```

```

Asp Ser Met Lys Asp Glu
    
```

20

35

<210> 11

<211> 29

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Pyr

45

<400> 11

```

Xaa Glu Gly Ala Pro Pro Gln Gln Ser Ala Arg Arg Asp Arg Met Pro
1           5           10           15
    
```

```

Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys Lys
                20           25
    
```

ES 2 734 884 T3

5 <210> 12  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> *Xenopus laevis*  
 <400> 12

Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser Ala Gly Lys Phe Gly Lys Ala Phe  
 1 5 10 15  
 Val Gly Glu Ile Met Lys Ser  
 20

10 <210> 13  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> *Xenopus laevis*  
 15 <400> 13

Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser Ala Lys Lys Phe Gly Lys Ala Phe  
 1 5 10 15  
 Val Gly Glu Ile Met Asn Ser  
 20

20 <210> 14  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> *Hyalophora cecropia*  
 25 <400> 14

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Glu Lys Val Gly Gln Asn Ile Arg  
 1 5 10 15  
 Asp Gly Ile Ile Lys Ala Gly Pro Ala Val Ala Val Val Gly Gln Ala  
 20 25 30  
 Thr Gln Ile Ala Lys

35

30 <210> 15  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> *Hyalophora cecropia*  
 35 <400> 15

Lys Trp Lys Val Phe Lys Lys Ile Glu Lys Met Gly Arg Asn Ile Arg  
 1 5 10 15  
 Asn Gly Ile Val Lys Ala Gly Pro Ala Ile Ala Val Leu Gly Glu Ala  
 20 25 30  
 Lys Ala Leu  
 35

<210> 16  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
  
 10 <400> 16  
  
     Ala Leu Tyr Lys Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Ser Ala Lys Lys  
     1                  5                  10                  15  
  
     Leu Gly  
  
 <210> 17  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 17  
  
           Lys Phe His Glu Lys His His Ser His Arg Gly Tyr  
           1                  5                  10  
  
 <210> 18  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 18  
  
     Asp Ser His Ala Lys Arg His His Gly Tyr Lys Arg Lys Phe His Glu  
     1                  5                  10                  15  
  
     Lys His His Ser His Arg Gly Tyr  
           20  
  
 30  
  
 <210> 19  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 35 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 19  
  
     Asp Ser His Ala Lys Arg His His Gly Tyr Lys Arg Lys Phe His Glu  
     1                  5                  10                  15  
  
     Lys His His Ser His Arg Gly Tyr Arg Ser Asn Tyr Leu Tyr Asp Asn  
           20                  25                  30  
  
 40  
  
 <210> 20  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
  
 <400> 20  
 50

ES 2 734 884 T3

Ala Lys Arg His His Gly Tyr Lys Arg Lys Phe His  
 1 5 10

5 <210> 21  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 21

Ala Cys Tyr Cys Arg Ile Pro Ala Cys Ile Ala Gly Glu Arg Arg Tyr  
 1 5 10 15

10 Gly Thr Cys Ile Tyr Gln Gly Arg Leu Trp Ala Phe Cys Cys  
 20 25 30

15 <210> 22  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Apis sp.*

<400> 22

Gly Asn Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Gln Pro Arg Pro Pro His Pro  
 1 5 10 15

Arg Ile

20 <210> 23  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> *Pyrrhocoris apterus*

25 <400> 23

Val Asp Lys Gly Ser Tyr Leu Pro Arg Pro Thr Pro Pro Arg Pro Ile  
 1 5 10 15

Tyr Asn Arg Asn

20

30 <210> 24  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 24

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys  
 1 5 10

40 <210> 25  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

ES 2 734 884 T3

<400> 25

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu  
 1 5 10 15

Ala Lys Leu Ala Lys  
 20

5

<210> 26  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 26

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu  
 1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val  
 20 25 30

Pro Arg Thr Glu Ser  
 35

15

<210> 27  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 27

Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu Phe Lys  
 1 5 10 15

Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val Pro Arg  
 20 25 30

Thr Glu Ser  
 35

25

<210> 28  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

30

<400> 28

Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu Phe Lys Arg Ile Val Gln  
 1 5 10 15

Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val Pro Arg Thr Glu Ser  
 20 25 30

35

<210> 29  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 29

ES 2 734 884 T3

Lys Leu Phe Lys Arg Ile Val Lys Arg Ile Leu Lys Phe Leu Arg Lys  
1 5 10 15

Leu Val

5 <210> 30  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> Bos sp.  
  
<400> 30

Gly Arg Phe Lys Arg Phe Arg Lys Lys Phe Lys Lys Leu Phe Lys Lys  
1 5 10 15

Leu Ser Pro Val Ile Pro Leu Leu His Leu  
20 25

10  
  
15 <210> 31  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> Sus sp.  
  
<400> 31

Arg Arg Arg Pro Arg Pro Pro Tyr Leu Pro Arg Pro Arg Pro Pro Pro  
1 5 10 15

Phe Phe Pro Pro Arg Leu Pro Pro Arg Ile Pro Pro Gly Phe Pro Pro  
20 25 30

Arg Phe Pro Pro Arg Phe Pro  
35

20  
  
25 <210> 32  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> Sus sp.  
  
<400> 32

Arg Arg Arg Pro Arg Pro Pro Tyr Leu Pro Arg Pro Arg Pro Pro Pro  
1 5 10 15

Phe Phe Pro Pro Arg Leu Pro Pro Arg Ile  
20 25

30 <210> 33  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Sus sp.  
  
35 <400> 33

Arg Arg Arg Pro Arg Pro Pro Tyr Leu Pro Arg Pro Arg Pro Pro Pro  
1 5 10 15

Phe Phe Pro

ES 2 734 884 T3

5 <210> 34  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Sus sp.  
 <400> 34

Arg Arg Arg Pro Arg Pro Pro Tyr Leu Pro Arg  
 1 5 10

10 <210> 35  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Sus sp.  
 15 <400> 35

Arg Leu Cys Arg Ile Val Val Ile Arg Val Cys Arg  
 1 5 10

20 <210> 36  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Sus sp.  
 25 <400> 36

Arg Gly Gly Arg Leu Cys Tyr Cys Arg Arg Arg Phe Cys Val Cys Val  
 1 5 10 15

Gly Arg

30 <210> 37  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Sus sp.  
 35 <400> 37

Arg Gly Gly Leu Cys Tyr Cys Arg Gly Arg Phe Cys Val Cys Val Gly  
 1 5 10 15

Arg

40 <210> 38  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
 <400> 38

Lys Lys Lys Lys Pro Leu Phe Gly Leu Phe Phe Gly Leu Phe  
 1 5 10

50 <210> 39  
 <211> 13  
 <212> PRT



ES 2 734 884 T3

<213> Bos sp.

<400> 39

5                   Ile Leu Pro Trp Lys Trp Pro Trp Trp Pro Trp Arg Arg  
1   5   10

<210> 40

<211> 13

<212> PRT

10 <213> Bos sp.

<400> 40

Ile Leu Pro Trp Lys Trp Pro Trp Trp Pro Trp Arg Arg  
1   5   10

15

<210> 41

<211> 13

<212> PRT

20 <213> Bos sp.

<400> 41

Ile Leu Lys Lys Trp Pro Trp Trp Pro Trp Arg Arg Lys  
1   5   10

25

<210> 42

<211> 13

<212> PRT

<213> Bos sp.

30 <400> 42

Ile Leu Lys Lys Trp Pro Trp Trp Pro Trp Arg Arg Lys  
1   5   10

35

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 43

40

Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala  
1   5   10

<210> 44

<211> 18

45 <212> PRT

<213> *Limulus polyphemus*

<400> 44

Arg Arg Trp Cys Phe Arg Val Cys Tyr Arg Gly Phe Cys Tyr Arg Lys  
1   5   10   15

50

Cys Arg

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

55 <213> *Tachypleus tridentatus*

ES 2 734 884 T3

<400> 45

Lys Trp Cys Phe Arg Val Cys Tyr Arg Gly Ile Cys Tyr Arg Arg Cys  
1 5 10 15

Arg

5

<210> 46

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 46

15

Lys Arg Phe Lys  
1

<210> 47

<211> 18

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (5)..(14)

<223> Cualquier aminoácido y esta región puede abarcar de 0 a 10 restos

30

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (16)..(17)

<223> Cualquier aminoácido

35

<400> 47

Lys Arg Phe Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Xaa  
1 5 10 15

Xaa Trp

40

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 48

Lys Arg Phe Lys Gln Asp Gly Gly Trp Ser His Trp Ser Pro Trp Ser  
1 5 10 15

Ser

50

<210> 49

ES 2 734 884 T3

<211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
 <400> 49

Lys Arg Phe Lys Gln Asp Gly Gly Trp Ser His Trp Ser Pro  
 1 5 10

10 <210> 50  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 15 <213> Desconocido

<220>  
 <223> Descripción de desconocido: péptido inhibidor de bFGF

20 <400> 50

Lys Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu  
 1 5

25 <210> 51  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
 <400> 51

Met Trp Tyr Arg Pro Asp Leu Asp Glu Arg Lys Gln Gln Lys Arg Glu  
 1 5 10 15

35 <210> 52  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 40 <213> *Leiurus quinquestriatus*

<220>  
 221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Pyr

45 <400> 52

Xaa Phe Thr Asn Val Ser Cys Thr Thr Ser Lys Glu Cys Trp Ser Val  
 1 5 10 15

Cys Gln Arg Leu His Asn Thr Ser Arg Gly Lys Cys Met Asn Lys Lys  
 20 25 30

Cys Arg Cys Tyr Ser  
 35

50 <210> 53

<211> 35  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 53

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
 1 5 10 15

Met Gly Gln Val Gly Arg Gln Leu Ala Ile Ile Gly Asp Asp Ile Asn  
 20 25 30

Arg Arg Tyr  
 35

10  
 15 <210> 54  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-Lys

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 <223> D-Leu

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (10)..(10)  
 <223> D-Ala

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)..(11)  
 <223> D-Lys

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)..(12)  
 <223> D-Leu

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)..(13)  
 <223> D-Ala

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)..(15)  
 <223> D-Lys

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> D-Leu

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (17)..(17)  
 5 <223> D-Ala

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (18)..(18)  
 10 <223> D-Lys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (19)..(19)  
 15 <223> D-Leu

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 20 <223> D-Ala

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (21)..(21)  
 25 <223> D-Lys

<400> 54

Cys Asn Gly Arg Cys Gly Gly Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu  
 1 5 10 15

Ala Lys Leu Ala Lys  
 20

30 <210> 55  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

40 <400> 55

Cys Asn Gly Arg Cys Gly Gly Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu  
 1 5 10 15

Ala Lys Leu Ala Lys  
 20

45 <210> 56  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 56

Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr  
 1 5 10

ES 2 734 884 T3

<210> 57  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

10

<400> 57

Thr Ser Leu Asp Ala Ser Ile Trp Ala Met Met Gln Asn Ala  
1 5 10

<210> 58  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20

<400> 58

Lys Arg Ile Trp Phe Ile Pro Arg Ser Ser Trp Tyr Glu Arg Ala  
1 5 10 15

25

<210> 59  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 59

Thr Ser Leu Asp Ala Thr Met Ile Trp Thr Met Met  
1 5 10

35

<210> 60  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

45

<400> 60

Thr Ala Leu Asp Trp Ser Trp Leu Gln Thr Glu  
1 5 10

50

<210> 61  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 61

ES 2 734 884 T3

Thr Thr Leu Asp Trp Ser Trp Leu Gln Met Glu  
1 5 10

5 <210> 62  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
<400> 62

Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe  
1 5

15 <210> 63  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
<400> 63

Gln Leu Arg Arg Pro Ser Asp Arg Glu Leu Ser Glu  
1 5 10

25 <210> 64  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
<400> 64

Gln Arg Lys Arg Gln Lys Leu Met Pro  
1 5

40 <210> 65  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
<400> 65

Asp Asp Arg His Asp Ser Gly Leu Asp Ser Met Lys Asp Glu  
1 5 10

50 <210> 66  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Marcador de 6xHis sintético  
<400> 66

60

ES 2 734 884 T3

His His His His His His  
1 5

5 <210> 67  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
<400> 67

Lys Lys Lys Lys  
1

15 <210> 68  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
<400> 68

Lys Lys Lys Arg  
1

25 <210> 69  
<211> 4  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
35 <400> 69

Lys Lys Arg Lys  
1

40 <210> 70  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
<400> 70

Lys Lys Arg Arg  
1

50 <210> 71  
<211> 4  
<212> PRT  
55 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético



<400> 71

Lys Arg Arg Lys  
1

5 <210> 72  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 72

Lys Arg Arg Arg  
1

15  
20 <210> 73  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25 <400> 73

Arg Arg Arg Arg  
1

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

- 5 una cadena principal polimérica que comprende polilisina, poliornitina, poliarginina, poliglutamato, poliaspartato, policisteína, poliserina, politreonina, politirosina, heparina, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de heparano, sulfato de queratano, carragenina, pectina, fucoidano o dextrano; múltiples cadenas protectoras, en donde cada cadena protectora comprende poli(etilenglicol) y está unida covalentemente con la cadena principal polimérica por un enlace simple;
- 10 un miembro de grupo o grupos aniónicos seleccionado del grupo que consiste en sulfato, sulfonato, fosfato y carboxilo, estando dicho grupo aniónico unido covalentemente mediante un enlace químico simple con una unidad monomérica de la cadena principal polimérica; y una molécula de carga unida directamente mediante interacción iónica con el grupo aniónico sin ion metálico intermediario;
- 15 en donde la molécula de carga
- i) comprende un péptido penetrante celular;
  - ii) comprende un dominio de unión aniónico; o
  - iii) tiene un punto isoelectrónico mayor de 7,3.
- 20

2. La composición de la reivindicación 1, en donde el poli(etilenglicol) es alcoxi poli(etilenglicol).

3. La composición de la reivindicación 2, en donde el alcoxi poli(etilenglicol) es metoxi poli(etilenglicol).

25 4. La composición de la reivindicación 1, en donde la molécula de carga se selecciona de un grupo que consiste en: (i) un péptido; (ii) una proteína; y (iii) una molécula orgánica pequeña.

30 5. La composición de la reivindicación 1 o 4, en donde la molécula de carga es un péptido o una proteína que comprende una secuencia contigua penetrante celular de 5-10 aminoácidos y en donde el número de aminoácidos básicos (lisina y arginina) menos el número de aminoácidos ácidos (glutamato y aspartato) es 2 o más.

35 6. La composición de la reivindicación 5, en donde la secuencia contigua penetrante celular en el péptido comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en: 1) Lys-Lys-Lys-Lys, 2) Lys-Lys-Lys-Arg, 3) Lys-Lys-Arg-Lys, 4) Lys-Lys-Arg-Arg, 4) Lys-Arg-Arg-Lys, 5) Lys-Arg-Arg-Arg y 6) Arg-Arg-Arg-Arg, en donde cualquier aminoácido puede ser isómero D o L y la orientación de la secuencia presentada puede ser de amino a carboxilo o de carboxilo a amino.

7. La composición de la reivindicación 1, en donde

- 40 a) la molécula de carga es un agente antiinfeccioso seleccionado del grupo que consiste en lisostafina, interferón y las SEQ ID NO: 12-45, en donde cuando la molécula de carga es interferón, la cadena principal polimérica comprende heparina o condroitina; o
- b) la molécula de carga comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 1-59; o
- 45 c) la molécula de carga comprende un péptido antiinflamatorio seleccionado de un grupo que consiste en: (i) los últimos 11 aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, (ii) los últimos 8 aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, (iii) los últimos 12 aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, (iv) los últimos 10 aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, y (v) los últimos 14 aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; o
- (d) la molécula de carga que comprende un péptido antiinflamatorio seleccionado de un grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-11; o
- 50 (e) la molécula de carga es un factor de crecimiento o un agente antiapoptótico que comprende una secuencia peptídica seleccionada de las SEQ ID NO: 31-34, 46-49 inclusive, un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), un factor de crecimiento transformante (TGF), factor de crecimiento nervioso (NGF) y un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); o
- 55 (f) la molécula de carga es un inhibidor del crecimiento celular, inhibidor del crecimiento de cicatrices o agente proapoptótico que comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 50-59, o la molécula de carga es un interferón, en donde cuando la molécula de carga comprende interferón, la cadena principal polimérica comprende heparina o condroitina.

60 8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 7, en donde la cadena principal polimérica comprende polilisina.

9. La composición de la reivindicación 8, en donde la molécula de carga se selecciona del grupo que consiste en FGF, HGF y las SEQ ID NO: 26-29 y 32-34.

65 10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 7, en donde la cadena principal polimérica

comprende condroitina.

11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 7 y 8, en donde la molécula de carga es EGF de unión a heparina, lisostafina o comprende la SEQ ID NO: 31.

5

12. Una composición farmacéutica que comprende:

la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11; y  
un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10

13. La composición según la reivindicación 7, parte a) o b) para su uso en un método para tratar la infección en un sujeto; o

la composición según la reivindicación 7, parte c) o d) para su uso en un método para tratar la inflamación en un sujeto; o

15 la composición según la reivindicación 7, parte e) para su uso en un método para tratar el daño orgánico o celular en un sujeto que necesite crecimiento o prevención de la apoptosis; en donde dichos métodos comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de la composición.

20

14. La composición para su uso según la reivindicación 13 en donde:

(a) la inflamación está asociada con artritis, enfermedad inflamatoria del intestino crónica, esclerosis múltiple, diabetes, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o artritis reumatoide; o

(b) el daño orgánico o celular está:

25

(i) provocado por lesión por radiación;

(ii) en el intestino;

(iii) en la médula ósea;

(iv) en el hígado;

(v) en el corazón;

30

(vi) provocado por infarto de miocardio;

(vii) provocado por enfermedad autoinmunitaria; o

(viii) provocado por diabetes de tipo 1.

35

15. La composición según la reivindicación 7, parte f) para su uso en el tratamiento del cáncer o exceso de crecimiento de células o cicatrices, en donde la molécula de carga comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 50-59, o comprende un interferón alfa o interferón gamma.

**Figura 1**

