

06-98638



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

06 98638

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

COMPOSICIONES Y METODOS PARA DIAGNOSTICO TOPICO

Y TRANSPORTE TERAPEUTICO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K38/17.

71. SOLICITANTE

ESSENTIA BIOSYSTEMS, INC

DOMICILIO

MOUNTAIN VIEW, CALIFORNIA 94043, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438,019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

29/09/2006.

SS


Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Rad: 06-098638- -00000-0000

Fee: 2006-09-29 17:49:59 Dep. 2020 NUECREACIONES

Trá. 11 PATENTEYI

EYE 378 FASENACIONAL

Act 411 PRESENTACION

Folios: 269

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT**
ENTRADA EN FASE NACIONAL 03-10-06
SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

 Nombre: **ESSENTIA BIOSYSTEMS, INC.**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes del Estado de Delaware, Estados
Unidos de América.

 Dirección: 1928B Old Middlefield Way,
Mountain View
California 94043
Estados Unidos de América

 Domicilio: Mountain View,
California 94043
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

 Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@camyp.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

 Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

 1. **Michael D. DAKE**
665 Gerona Road,
Stanford
California 94305
Estados Unidos de América

 2. **Jacob M. WAUGH**
4020 El Camino Real #1116
Mountain View
California 94040
Estados Unidos de América

5

PCT (86)

 Solicitud Internacional No. PCT/US2005/006931

 Fecha: 3 de marzo de 2005

 Publicación Internacional No. WO 2005/120546 A2

 Fecha: 22 de diciembre de 2005

6

Título (54)
**COMPOSICIONES Y METODOS PARA DIAGNOSTICO TOPICO Y TRANSP RTE
TERAPEUTICO**

7

Clasificación Internacional (51) A61K 38/17

8

Prioridad

 SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

3 de marzo de 2004

(31) Número de Solicitud

60/550.014

9

Comprobante de pago No.: 06-73.831
Fecha: 25 de septiembre de 2006

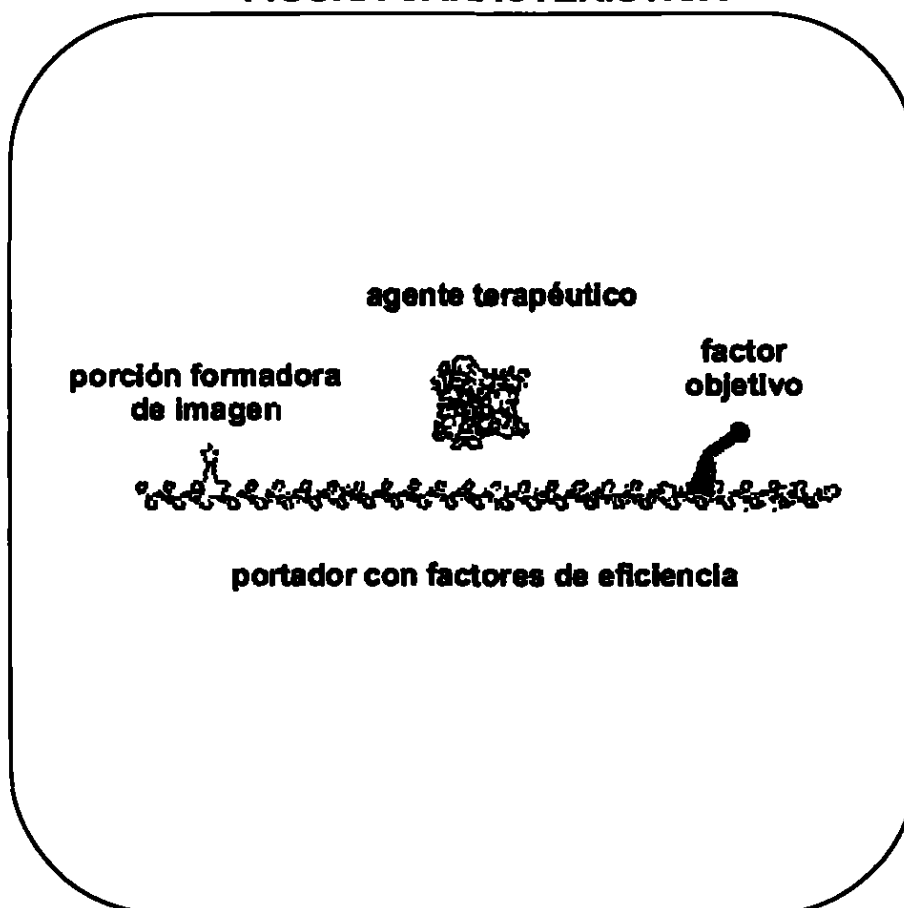
10

An xos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 463.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

EMILIO FERRERO

FIRMA :

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

JDF

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ **Publicación Internacional WO 2005/120546 A2**
2. ☒ **Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.**
3. ☒ **Extracto de publicación.**

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



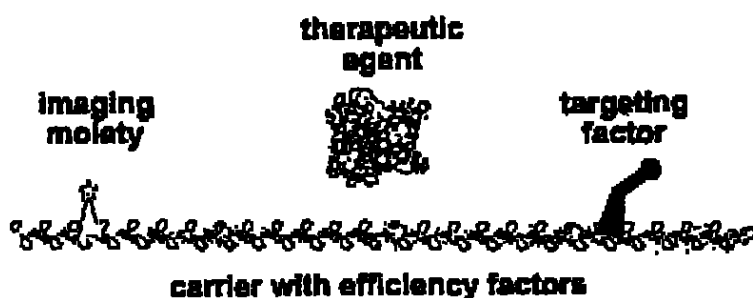
(43) International Publication Date
22 December 2005 (22.12.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/120546 A2

- (51) International Patent Classification²: A61K 38/17
- (21) International Application Number: PCT/US2005/006931
- (22) International Filing Date: 3 March 2005 (03.03.2005)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/550,014 3 March 2004 (03.03.2004) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): ESSENTIA BIOSYSTEMS, INC. [US/US]; 1928B Old Middlefield Way, Mountain View, California 94043 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): DAKE, Michael, D.; 665 Geron Road, Stanford, California 94305 (US). WAUGH, Jacob, M.; 4020 El Camino Real #1116, Mountain View, California 94040 (US).
- (74) Agent: ENG, Joseph, D., Jr.; Morgan & Finnegan, LLP, 3 World Financial Center, New York, New York 10281-2101 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR TOPICAL DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC TRANSPORT



(57) Abstract: Compositions and methods are provided that are useful for the delivery, including transdermal delivery, of biologically active agents, such as non-protein non-nucleotide therapeutics and protein-based therapeutics excluding insulin, botulinum toxins, antibody fragments, and VEGF. The compositions and methods are particularly useful for topical delivery of antifungal agents and antigenic agents suitable for immunization. Alternately, the

compositions can be prepared with components useful for targeting the delivery of the compositions as well as imaging components.

WO 2005/120546 A2

COMPOSITIONS AND METHODS FOR TOPICAL DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC TRANSPORT

CROSS-REFERENCES TO RELATED APPLICATIONS

[0001] This application claims priority to U.S. Provisional Application Serial No. 60/550,014, filed March 3, 2004, the contents of which are incorporated herein by reference in its entirety.

STATEMENT AS TO RIGHTS TO INVENTIONS MADE UNDER FEDERALLY SPONSORED RESEARCH AND DEVELOPMENT

[0002] Not applicable.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0003] Skin protects the body's organs from external environmental threats and acts as a thermostat to maintain body temperature. It consists of several different layers, each with specialized functions. The major layers include the epidermis, the dermis and the hypodermis. The epidermis is a stratifying layer of epithelial cells that overlies the dermis, which consists of connective tissue. Both the epidermis and the dermis are further supported by the hypodermis, an internal layer of adipose tissue.

[0004] The epidermis, the topmost layer of skin, is only 0.1 to 1.5 millimeters thick (Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society, 1-7 (1998)). It consists of keratinocytes and is divided into several layers based on their state of differentiation. The epidermis can be further classified into the stratum corneum and the viable epidermis, which consists of the granular melphigian and basal cells. The stratum corneum is hygroscopic and requires at least 10% moisture by weight to maintain its flexibility and softness. The hygroscopicity is attributable in part to the water-holding capacity of keratin. When the horny layer loses its softness and flexibility it becomes rough and brittle, resulting in dry skin.

[0005] The dermis, which lies just beneath the epidermis, is 1.5 to 4 millimeters thick. It is the thickest of the three layers of the skin. In addition, the dermis is also home to most of the skin's structures, including sweat and oil glands (which secrete substances through openings in the skin called pores, or comedos), hair follicles, nerve endings, and blood and lymph vessels (Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society, 1-7 (1998)). However, the main components of the dermis are collagen and elastin.

[0006] The hypodermis is the deepest layer of the skin. It acts both as an insulator for body heat conservation and as a shock absorber for organ protection (Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society, 1-7 (1998)). In addition, the hypodermis also stores fat for energy reserves. The pH of skin is normally between 5 and 6. This acidity is due to the presence of amphoteric amino acids, lactic acid, and fatty acids from the secretions of the sebaceous glands. The term "acid mantle" refers to the presence of the water-soluble substances on most regions of the skin. The buffering capacity of the skin is due in part to these secretions stored in the skin's horny layer.

[0007] Wrinkles, one of the telltale signs of aging, can be caused by biochemical, histological, and physiologic changes that accumulate from environmental damage (Benedetto, International Journal of Dermatology, 38:641-655 (1999)). In addition, there are other secondary factors that can cause characteristic folds, furrows, and creases of facial wrinkles (Stegman et al., The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery, 2nd ed., St. Louis, MO: Mosby Year Book: 5-15 (1990)). These secondary factors include the constant pull of gravity, frequent and constant positional pressure on the skin (i.e., during sleep), and repeated facial movements caused by the contraction of facial muscles (Stegman et al., The Skin of the Aging Face Cosmetic Dermatological Surgery, 2nd ed., St. Louis, MO: Mosby Year Book: 5-15 (1990)). Different techniques have been utilized in order potentially to mollify some of the signs of aging. These techniques range from facial moisturizers containing alpha hydroxy acids and retinol to surgical procedures and injections of neurotoxins.

[0008] One of the principal functions of skin is to provide a barrier to the transportation of water and substances potentially harmful to normal homeostasis. The body would rapidly dehydrate without a tough, semi-permeable skin. The skin helps to prevent the entry of harmful substances into the body. Although most substances cannot penetrate the barrier, a number of strategies have been developed to selectively increase the permeability of skin with variable success.

[0009] Since non-protein non-nucleotide therapeutic agent such as antifungals cannot penetrate the skin efficiently, in order to provide the therapeutic effects antifungal agents, it must currently be injected into the skin or administered systemically. The Federal Food and Drug Administration has approved such a procedure, for treatment of fungal infection. In such treatments, the antifungal agent is administered by monitored injection or dosage.

However, such treatment can be cause adverse side effects. Topical application of antifungal agents provides a local delivery for a safer and more desirable treatment alternative due to painless nature of application, reduced training to apply the antifungal therapeutic, smaller doses necessary to affect and to reach a therapeutic clinical result and limiting side effects typically associated with systemic delivery.

[0010] Since antigenic agents suitable for immunization cannot penetrate the skin efficiently, in order to provide the therapeutic effects of antigenic agents suitable for immunization the toxin must currently be injected into the skin. The Federal Food and Drug Administration has approved such a procedure, for treatment of for example, malaria, rabies, anthrax, tuberculosis, or related to childhood immunizations such as hepatitis B, diphtheria, pertussis, tetanus, Haemophilus influenza type b, inactivated poliovirus, measles, mumps, rubella, varicella, pneumococcus, hepatitis A, and influenza. In such treatments, the antigenic agent for immunization is administered by monitored injection. However, such treatment can be uncomfortable and more typically involves some pain. Topical application of antigenic agent for immunization provides for a safer and more desirable treatment alternative due to painless nature of application, the larger treatment surface area that can be covered, reduced training to apply the therapeutic, smaller doses necessary to affect and to reach a therapeutic clinical result.

[0011] Transdermal administration of other therapeutics is also an area of great interest due, for instance, to the potential for decreased patient discomfort, direct administration of therapeutic agents into the bloodstream, and the opportunities for monitored delivery via the use of specially constructed devices and/or of controlled release formulations and techniques.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0012] The present invention provides new methods and compositions that are broadly applicable to compositions of diverse therapeutic or cosmeceutical agents that can be targeted or imaged to maximize delivery to a particular site.

[0013] This invention further relates to formulations for transdermal delivery of proteins other than insulin, botulinum toxin, antibody fragments, and VEGF – preferably those having a molecular weight of less than 20,000 kD. Such protein-based agents can include for example an antigen suitable for immunization. In another aspect the present

invention relates to formulations for transdermal delivery of a non-protein non-nucleotide therapeutic agent such as for example certain antifungals. The invention specifically excludes insulin, botulinum toxins, VEGF and antibody fragments when the term "therapeutic" or "biologically active protein" is employed. Since antigens suitable for immunization have other biological activities such as mounting an immune response, these remain included in the appropriate aspects of this invention, however.

[0014] This invention further relates to formulations for transdermal delivery of a non-protein non-nucleotide therapeutic agent such as antifungals. Suitable antifungal agents include, for example, amphotericin B, fluconazole, flucytosine, itraconazole, ketoconazole, clotrimazole, econazole, griseofulvin, miconazole, nystatin or ciclopirox and the like.

[0015] This invention further relates to formulations for transdermal delivery of antigenic agents suitable for immunization can be protein-based antigens, non-protein non-nucleotide agents or hybrids thereof. Suitable antigens include, for example, those for environmental agents, pathogens or biohazards. Suitable agents preferably include, for example, malaria, rabies, anthrax, tuberculosis, or related to childhood immunizations such as hepatitis B, diphtheria, pertussis, tetanus, Haemophilus influenza type b, inactivated poliovirus, measles, mumps, rubella, varicella, pneumococcus, hepatitis A, and influenza.

[0016] Since antigens suitable for immunization have other biological activities such as mounting an immune response, these remain included in the appropriate aspects of this invention, however. Agents which do not readily cross skin but are substantially smaller than for example insulin – most preferably agents less than 20,000 kD – or have different physiochemical properties can be delivered through still another aspect of this invention. Specifically, antigens desirable for immunizations can be transported across skin without injection through the present invention. The result affords an injection-free alternative to childhood immunizations or potentially important biohazards or environmental hazards. Further, non-protein, non-nucleotide therapeutic such as certain of the antifungal agents, for example, have been characterized by poor topical penetration particularly for fungal infections such as onychomycosis or infection of the fingernails and nail plates.

[0017] This invention accordingly further relates to topical formulations for transdermal delivery of therapeutic and diagnostic substances, including proteins particularly those having a molecular weight of less than 20,000 kD or other biologically active agent such as, for example, a non-protein non-nucleotide therapeutic agent such as certain

antifungals or alternately an agent for immunization. Since antigens suitable for immunization have other biological activities such as mounting an immune response, these remain included in the appropriate aspects of this invention, however. Suitable antifungal agents include, for example, amphotericin B, fluconazole, flucytosine, itraconazole, ketoconazole, clotrimazole, econazole, griseofulvin, miconazole, nystatin or ciclopirox and the like. Suitable agents preferably include, for example, malaria, rabies, anthrax, tuberculosis, or related to childhood immunizations such as hepatitis B, diphtheria, pertussis, tetanus, Haemophilus influenza type b, inactivated poliovirus, measles, mumps, rubella, varicella, pneumococcus, hepatitis A, and influenza.

[0018] This invention provides a composition having a biologically active protein and a carrier. The carrier includes a polymeric backbone having attached positively charged branching groups and is present in an effective amount for transdermal delivery. The association between the carrier and the biologically active protein is non-covalent.

[0019] Another object of this invention is to provide a composition containing a non-protein, non-nucleotide biologically active agent and a carrier. The carrier includes a polymeric backbone having attached positively charged branching groups and is present in an effective amount for transdermal delivery. The association between the carrier and the non-protein, non-nucleotide biologically active agent is non-covalent.

[0020] Yet another object of this invention is to provide a kit for administration of a biologically active protein to a subject. The kit includes a device for delivering the biologically active protein to the skin or epithelium of the subject and a composition having a polymeric carrier with attached positively charged branching groups. The positively charged branching groups may be selected from $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT and fragments thereof, and Antennapedia PTD and fragments thereof, where the subscript $n1$ is an integer of from 0 to about 20, and the subscript $n2$ is independently an odd integer of from about 5 to about 25. The association between the carrier and the biologically active protein is non-covalent.

[0021] This invention also provides a method of administering a biologically active protein to a subject. The method includes topically applying to the skin or epithelium of the subject the protein in conjunction with an effective amount of a carrier. The carrier includes a polymeric backbone having attached positively charged branching groups. The association between the carrier and the biologically active protein is non-covalent.

[0022] Additionally, the invention provides a method of administering a non-protein, non-nucleotide biologically active agent to a subject. The method includes topically applying to the skin or epithelium of the subject the biologically active agent in conjunction with an effective amount of a carrier. The carrier may include a polymeric backbone having attached positively charged branching groups. The association between the carrier and the biologically active agent is non-covalent.

[0023] One object of this invention is to provide a composition containing an antigen suitable for immunization and a carrier. The carrier includes a polymeric backbone having attached positively charged branching groups and is present in an effective amount for transdermal delivery. The association between the carrier and the antigen is non-covalent. Another object of this invention is to provide a kit for administration of an antigen suitable for immunization to a subject. The kit includes a device for delivering the antigen suitable for immunization to the skin or epithelium and a composition with a carrier. The carrier includes a polymeric backbone having attached positively charged branching groups selected from $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT and fragments thereof, and Antennapedia PTD, where the subscript $n1$ is an integer of from 0 to about 20, and the subscript $n2$ is independently an odd integer of from about 5 to about 25. The association between the carrier and the antigen is non-covalent.

[0024] Yet another object of this invention is to provide a method of administering an antigen suitable for immunization to a subject. The method includes topically applying to the skin or epithelium of the subject the antigen suitable for immunization in conjunction with an effective amount of a carrier. The carrier contains a polymeric backbone having attached positively charged branching groups. The association between the carrier and the antigen is non-covalent.

[0025] This invention also provides a composition containing an imaging moiety and/or a targeting agent and a carrier. The carrier includes a polymeric backbone having attached positively charged branching groups and is present in an effective amount for transdermal delivery. The association between the carrier and the imaging moiety or targeting agent is non-covalent.

[0026] In one aspect, the present invention provides a composition comprising a non-covalent complex of:

- a) a positively-charged backbone; and

b) at least one member selected from:

- i) a first negatively-charged backbone having a plurality of attached imaging moieties, or a plurality of negatively-charged imaging moieties;
- ii) a second negatively-charged backbone having a plurality of attached targeting agents, or a plurality of negatively-charged targeting moieties;
- iii) a non-protein non-nucleotide biologically active agent
- iv) a therapeutic protein other than insulin, botulinum toxin, antibody fragments, or VEGF.

wherein the complex carries a net positive charge.

[0027] The biological agents, in this aspect of the invention, can be either a therapeutic agent or a cosmeceutical agent. The invention specifically excludes insulin, botulinum toxins, VEGF and antibody fragments when the term "therapeutic" or "biologically active protein" is employed. Since antigens suitable for immunization have other biological activities such as mounting an immune response, these remain included in the appropriate aspects of this invention, however. Alternatively, candidate agents can be used to determine in vivo efficacy in these non-covalent complexes.

[0028] In another aspect, the present invention provides a composition comprising a non-covalent complex of a positively-charged backbone having at least one attached efficiency group and an agent for molecular imaging, for example an optical imaging agent. Most preferably, in this application, the agent will be targeted to a particular agent for diagnostic and/or therapeutic effect. For example, an optical imaging agent can be associated with a positively-charged backbone and a component to target melanoma for targeted topical diagnosis of melanoma. In another aspect, the present invention provides a method for delivery of a biological agent to a cell surface in a subject, said method comprising administering to said subject a composition as described above.

[0029] In yet another aspect, the present invention provides a method for preparing a pharmaceutical or cosmeceutical composition, the method comprising combining a positively charged backbone component and at least one member selected from:

- i) a first negatively-charged backbone having a plurality of attached imaging moieties, or a plurality of negatively-charged imaging moieties;

- ii) a second negatively-charged backbone having a plurality of attached targeting agents, or a plurality of negatively-charged targeting moieties;
- iii) a non-protein non-nucleotide biologically active agent
- iv) a therapeutic protein other than insulin, botulinum toxins, VEGF and antibody fragments

with a pharmaceutically or cosmeceutically acceptable carrier to form a non-covalent complex having a net positive charge.

[0030] In still another aspect, the present invention provides a kit for formulating a pharmaceutical or cosmeceutical delivery composition, the kit comprising a positively charged backbone component and at least one component selected from groups i) through iv) above, along with instructions for preparing the delivery composition.

[0031] In yet another aspect, this invention relates to a composition comprising a biologically active agent such as protein having a molecular weight of less than 20,000 kD and other biologically active agents such as, for example, a non-protein non-nucleotide therapeutic agent such as certain antifungals or alternately an agent for immunization, and a carrier comprising a positively charged carrier having a backbone with attached positively charged branching or "efficiency" groups, all as described herein.

[0032] The biologically active agent may be protein-based (e.g., a protein having a molecular weight of less than 20,000 kD), a non-protein, non nucleotide therapeutic agent (e.g., certain antifungal agents), or an antigen for immunization. Suitable antifungal agents include, for example, amphotericin B, fluconazole, flucytosine, itraconazole, ketoconazole, clotrimazole, econazole, griseofulvin, miconazole, nystatin or ciclopirox and the like. As employed herein, the antigenic agents suitable for immunization can be protein-based antigens which do not therapeutically alter blood glucose levels, non-protein non-nucleotide agents or hybrids thereof. Thus, the agents included are themselves antigens suitable for immunization. Suitable antigens include, for example, those for environmental agents, pathogens or biohazards. Other examples of suitable antigens include those that may be used for immunizations against malaria, rabies, anthrax, tuberculosis, or those related to childhood immunizations such as hepatitis B, diphtheria, pertussis, tetanus, Haemophilus influenza type b, inactivated poliovirus, measles, mumps, rubella, varicella, pneumococcus, hepatitis A, and influenza.

[0033] Most preferably, the positively charged carrier is a long-chain positively charged polypeptide or a positively charged nonpeptidyl polymer, for example, a polyalkyleneimine. Proteins and non-protein, non-nucleotide therapeutics that are not normally capable of crossing the skin or epithelium appreciably [relative to the complex of the same agent and the carriers of the present invention] and that do not have a therapeutic effect on lowering blood glucose have widely differing surface and physiochemical properties that normally would make it uncertain whether a technique that afforded transdermal delivery of, for example, insulin would be applicable to the protein and non-protein therapeutics. However, carriers of this invention that have a positively charged backbone with positively charged branching groups, as described herein, are quite surprisingly capable of providing transdermal delivery of protein and non-protein therapeutics.

[0034] Particular carriers suited for transdermal delivery of particular proteins can easily be identified using tests such as those described in the Examples. Such a protein may, for example be a small protein having a molecular weight of less than 20,000 kD. As used herein, the word "therapeutic" in the context of blood glucose refers to a decline in blood glucose levels sufficient to alleviate acute symptoms or signs of hyperglycemia, for example in diabetic patients.

[0035] This invention also provides a method for preparing a pharmaceutical or cosmeceutical composition that comprises combining a carrier comprising a positively charged polypeptide or a positively charged nonpeptidyl polymer such as a long-chain polyalkyleneimine (where the polypeptide or nonpeptidyl polymer has positively charged branching or "efficiency" groups as defined herein) with a biologically active agent such as, for example, protein having a molecular weight of less than 20,000 kD. Alternatively, the carrier may be combined with other biologically active agents such as, for example, a non-protein, non-nucleotide therapeutic agent (e.g., certain antifungals) or alternatively an agent for immunization.

[0036] The present invention also provides a kit for preparing or formulating a composition that comprises the carrier and a therapeutic substance, as well as such additional items that are needed to produce a usable formulation, or a premix that may in turn be used to produce such a formulation. Such a kit may consist of an applicator or other device for applications of the compositions or components thereof according to the methods of the

present invention. As used herein, "device" can refer, for example, to an instrument or applicator suitable for delivering, mixing or otherwise preparing the compositions according to the methods of the present invention.

[0037] This invention also provides devices for transdermal transmission of a biologically active agent that is contained within a composition that includes a carrier comprising a positively charged polypeptide of preferably short chain to intermediate chain length or another long-chain nonpeptidyl polymeric carrier that has positively charged branching or "efficiency" groups as defined herein. Such devices may be as simple in construction as a skin patch, or may be more complicated devices that may include means for dispensing and monitoring the dispensing of the composition, and optionally means for monitoring the condition of the subject in one or more aspects, including monitoring the reaction of the subject to the substances being dispensed.

[0038] In another aspect of the invention, the device may contain only a therapeutic biologically active agent and a carrier that may be applied separately to the skin. Accordingly, the invention also comprises a kit that includes both a device for dispensing via the skin and a material that contains a positively charged carrier or backbone, and that is suitable for applying to the skin or epithelium of a subject.

[0039] In general, the invention also comprises a method for administering a biologically active agent that includes topically administering an effective amount of the biologically active agent in conjunction with a positively charged polypeptide or non-polypeptidyl polymer such as a polyalkyleneimine having positively charged branching groups, as described herein.

[0040] By "in conjunction with" is meant that the two components are administered in a combination procedure, which may involve either combining them in a composition, which is then administered to the subject, or administering them separately, but in a manner such that they act together to provide the requisite delivery of an effective amount of the biologically active agent. For example, a composition containing the positively charged carrier may first be applied to the skin of the subject, followed by applying a skin patch or other device containing the biologically active agent.

[0041] The invention also relates to methods of applying a biologically active agent to epithelial cells, including those other than epithelial skin cells, for example, epithelial ophthalmic cells or cells of the gastrointestinal system.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0042] Figure 1 provides a schematic representation the components used in the invention.

[0043] Figure 2 provides a schematic representation of several embodiments of the invention.

[0044] Figures 3-4 represent the results of transdermal delivery of a plasmid containing the transgene for E. coli beta-galactosidase as described in Example 2.

[0045] Figure 5 represents the results of transdermal delivery of a plasmid containing the transgene for E. coli beta-galactosidase as described in Example 3.

[0046] Figure 6 represents the results of transdermal delivery of a plasmid containing the transgene for E. coli beta-galactosidase as described in Example 4.

[0047] Figure 7 represents the results of transdermal delivery of a botulinum toxin as described in Example 5.

[0048] Figure 8 is a photographic depiction of the results of transdermal delivery of a botulinum toxin as described in Example 6.

[0049] Figure 9 is a photographic depiction that the imaging complexes of Example 9 follow the brightfield distribution (panels a and c) for melanoma pigmented cells with fluorescent optical imaging agents (panels b and d) for two different fields and different magnifications (panels a and b at 10X versus panels c and d at 40X magnifications).

[0050] Figure 10 is a photograph depiction showing positive NeutrAvidin staining as described in Example 10 at two different magnifications. Parts (a) and (b) of Figure 10a are at 10X magnification and parts (c) and (d) are at 20X magnification. Parts (e) and (f) of Figure 10(b) are at 20X magnification for repeated staining.

[0051] Figure 11 represents the results for relative toxicity for carrier backbones as described in Example 11.

[0052] Figure 12 represents the results of transdermal gene delivery efficiency as described in Example 11.

[0053] Figure 13 is a photographic depiction of selective delivery of optical imaging probe to CEA-positive cells showing a brightfield image of colon carcinoma and fibroblasts co-culture (panel a) and fluorescence image of colon carcinoma (panel b) as described in Example 11.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0054] The present invention provides a component-based system for selective, persistent delivery of imaging agents or other therapeutic agents. Individual features for the compositions can be selected by designating desired components in bedside formulations. Additionally, in one aspect, imaging and specific targeting moieties are provided to form a non-covalent (preferably ionic) complex with a positive backbone. By placing these components non-covalently in the complex, the invention obviates the need for attaching components in precise locations on a positive backbone, in contrast to other strategies which increase complexity and expense and decrease efficiency to a level that no successful combination has yet been reported due to steric limitations. In another aspect of the invention, certain substances can be transdermally delivered by use of certain positively charged carriers alone, without requiring the inclusion of a negative backbone. In these cases, the substance or a derivative thereof has sufficient functionalities to associate with the carriers of the present invention non-covalently, preferably ionically. The term "sufficient" in this context refers to an association that can be determined, for example, by change in particle sizing or functional spectrophotometry versus the components alone.

[0055] Further understanding of the invention is provided with reference to Figure 1. In this figure, the components are shown as (1) a solid backbone having attached positively charged groups (also referred to as efficiency groups shown as darkened circles attached to a darkened bar), for example $(\text{Gly})_{n1}-(\text{Arg})_{n2}$ (wherein the subscript $n1$ is an integer of from 3 to about 5, and the subscript $n2$ is an odd integer of from about 7 to about 17) or TAT domains; (2) imaging moieties (open triangles attached to a light bar); (3) targeting agents and/or (4) biologically active agents (open circles attached to a light bar) such as non-protein non-nucleotide therapeutic agents or protein-based therapeutics other than insulin, botulinum toxins, VEGF and antibody fragments; Figure 2 illustrates various examples of multicomponent compositions wherein the groups are depicted as set out in Figure 1. For example, in Figure 2, a first multi-component composition is illustrated in which a positively charged backbone has associated an imaging component, a targeting component, a therapeutic. A second multi-component composition is illustrated which is designed for diagnostic/prognostic imaging. In this composition the positively charged backbone is complexed with both optical imaging components and targeting components for example recognizing melanoma to create a topical melanoma detection platform. The present

invention, described more fully below, provides a number of additional compositions useful in therapeutic and diagnostic programs.

Compositions

[0056] The term "biologically active agent" as used herein refers to a therapeutic agent that cures a disease or alleviates a health-related problem (including health-related problems that are subjectively assessed and/or cosmetic). For example, the biologically active agent may be a therapeutic protein, and in certain embodiments, is preferably a protein with a molecular weight of less than 20,000 kD. Note, however, that the invention specifically excludes insulin, botulinum toxins, VEGF and antibody fragments when the term "therapeutic" or "biologically active protein" is employed. Since antigens suitable for immunization have other biological activities such as mounting an immune response, these remain included in the appropriate aspects of this invention, however. In other embodiments of the invention, the biologically active agent may be a non-protein, non-nucleotide agent, (e.g., certain antifungal agents). Other non-limiting examples of suitable biologically active agents are provided as discussed herein.

[0057] In all aspects of the present invention, the association between carriers as described herein and the biologically active agent is by non-covalent interaction, which can include, for example, ionic interactions, hydrogen bonding, van der Waals forces, or combinations thereof.

[0058] In certain embodiments, the present invention provides a composition comprising a non-covalent complex of:

- a) a positively-charged backbone; and
- b) at least one member selected from:
 - i) a first negatively-charged backbone having a plurality of attached imaging moieties, or a plurality of negatively-charged imaging moieties;
 - ii) a second negatively-charged backbone having a plurality of attached targeting agents, or a plurality of negatively-charged targeting moieties;
 - iii) a non-protein non-nucleotide biologically active agent
 - iv) a therapeutic protein other than insulin, botulinum toxins, VEGF and antibody fragments,

wherein the complex carries a net positive charge. In one group of embodiments, the composition comprises at least two members selected from groups i) through iv). In another group of embodiments, the composition comprises at least one member from each of groups i) and ii), and one selected from either iii) or iv). Preferably, the positively-charged backbone has a length of from about 1 to 4 times the combined lengths of the members from group b). Alternatively, the positively charged backbone has a charge ratio of from about 1 to 4 times the combined charge of the members from group b). In some embodiments, the charge density is uniform and the length and charge ratios are approximately the same. Size to size (length) ratios can be determined based on molecular studies of the components or can be determined from the masses of the components

[0059] By "positively charged", it is meant that the carrier has a positive charge under at least some solution-phase conditions, more preferably at least under some physiologically compatible conditions. More specifically, "positively charged" as used herein, means that the group in question contains functionalities that are charged under all pH conditions, such as a quaternary amine, or containing a functionality which can acquire positive charge under certain solution-phase conditions, such as pH changes in the case of primary amines. More preferably, "positively charged" as used herein refers to those functionalities that have the behavior of associating with anions over physiologically compatible conditions. Polymers with a multiplicity of positively-charged moieties need not be homopolymers, as will be apparent to one skilled in the art. Other examples of positively charged moieties are well known in the prior art and can be employed readily, as will be apparent to those skilled in the art. The positively charged carriers described in this invention which themselves do not have a therapeutic activity represent novel compounds which have utility, for example, in compositions and methods as described herein. Thus, in another aspect of the present invention, we detail these novel compounds which include any carrier which comprises a positively charged backbone having attached positively charged branching groups as described herein and which does not itself have a therapeutic biologic activity. The invention specifically excludes antibody fragments when the term "therapeutic" or "biologically active protein" is employed. Since antigens suitable for immunization have other biological activities such as mounting an immune response, these remain included in the appropriate aspects of this invention, however.

[0060] In another embodiment, the present invention provides a composition comprising a biologically active agent and a carrier comprising a positively charged backbone. The biologically active agent may be, for example, a protein (particularly those having a molecular weight of less than 20,000 kD), a non-protein non-nucleotide therapeutic agent (such as certain antifungals) or an agent for immunization. The carrier may be, for instance, a positively charged polypeptide or nonpeptidyl polymer, which may be either a hetero- or homopolymer such as a polyalkyleneimine. The polypeptide or nonpeptidyl polymer may have positively charged branching or "efficiency" groups as defined herein. Each protein-based therapeutic and non-nucleotide non-protein therapeutic has distinct physiochemical properties which alter the characteristics of the total complex. Such positively charged carriers are among the materials described below as positively charged backbones.

[0061] The invention also provides a method for administering a therapeutically effective amount of a biologically active agent comprising applying to the skin or epithelium of the subject (which may be a human or other mammal) the biologically active agent and an amount of the positively charged backbone having branching groups that is effective to provide transdermal delivery of the protein to the subject. In this method, the protein and the positively charged carrier may be applied as a pre-mixed composition, or may be applied separately to the skin or epithelium. For instance, the protein may be in a skin patch or other device and the carrier may be contained in a liquid or other type of composition that is applied to the skin before application of the skin patch.

Positively charged backbone

[0062] The positively-charged backbone (also referred to as a positively charged "carrier") is typically a linear chain of atoms, either with groups in the chain carrying a positive charge at physiological pH, or with groups carrying a positive charge attached to side chains extending from the backbone. Preferably, the positively charged backbone itself will not have a defined enzymatic or therapeutic biologic activity. The linear backbone is a hydrocarbon backbone which is, in some embodiments, interrupted by heteroatoms selected from nitrogen, oxygen, sulfur, silicon and phosphorus. The majority of backbone chain atoms are usually carbon. Additionally, the backbone will often be a polymer of repeating units (e.g., amino acids, poly(ethyleneoxy), poly(propyleneamine), polyalkyleneimine, and the like) but can be a heteropolymer. In one group of embodiments, the positively charged

backbone is a polypropyleneamine wherein a number of the amine nitrogen atoms are present as ammonium groups (tetra-substituted) carrying a positive charge. In another embodiment, the positively charged backbone is a nonpeptidyl polymer, which may be a hetero- or homopolymer such as a polyalkyleneimine, for example a polyethyleneimine or polypropyleneimine, having a molecular weight of from about 10,000 to about 2,500,000, preferably from about 100,000 to about 1,800,000, and most preferably from about 500,000 to about 1,400,000. In another group of embodiments, the backbone has attached a plurality of side-chain moieties that include positively charged groups (e.g., ammonium groups, pyridinium groups, phosphonium groups, sulfonium groups, guanidinium groups, or amidinium groups). The sidechain moieties in this group of embodiments can be placed at spacings along the backbone that are consistent in separations or variable. Additionally, the length of the sidechains can be similar or dissimilar. For example, in one group of embodiments, the sidechains can be linear or branched hydrocarbon chains having from one to twenty carbon atoms and terminating at the distal end (away from the backbone) in one of the above-noted positively charged groups. In all aspects of the present invention, the association between the carrier and the biologically active agent is by non-covalent interaction, non-limiting examples of which include ionic interactions, hydrogen bonding, van der Waals forces, or combinations thereof.

[0063] In one group of embodiments, the positively charged backbone is a polypeptide having multiple positively charged sidechain groups (e.g., lysine, arginine, ornithine, homoarginine, and the like). Preferably, the polypeptide has a molecular weight of from about 10,000 to about 1,500,000, more preferably from about 25,000 to about 1,200,000, most preferably from about 100,000 to about 1,000,000. One of skill in the art will appreciate that when amino acids are used in this portion of the invention, the sidechains can have either the D- or L-form (R or S configuration) at the center of attachment. Alternatively, the backbone can be an analog of a polypeptide such as a peptoid. See, for example, Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32:543 (1993); Zuckermann *et al. Chemtracts-Macromol. Chem.* 4:30 (1992); and Simon *et al. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89:9367 (1992)). Briefly, a peptoid is a polyglycine in which the sidechain is attached to the backbone nitrogen atoms rather than the α -carbon atoms. As above, a portion of the sidechains will typically terminate in a positively charged group to provide a positively charged backbone component. Synthesis of peptoids is described in, for example, U.S. Patent

No. 5,877,278. As the term is used herein, positively charged backbones that have a peptoid backbone construction are considered "non-peptide" as they are not composed of amino acids having naturally occurring sidechains at the α -carbon locations.

[0064] A variety of other backbones can be used employing, for example, steric or electronic mimics of polypeptides wherein the amide linkages of the peptide are replaced with surrogates such as ester linkages, thioamides (-CSNH-), reversed thioamide (-NHCS-), aminomethylene (-NHCH₂-) or the reversed methyleneamino (-CH₂NH-) groups, keto-methylene (-COCH₂-) groups, phosphinate (-PO₂RCH₂-), phosphonamidate and phosphonamidate ester (-PO₂RNH-), reverse peptide (-NHCO-), trans-alkene (-CR=CH-), fluoroalkene (-CF=CH-), dimethylene (-CH₂CH₂-), thioether (-CH₂S-), hydroxyethylene (-CH(OH)CH₂-), methyleneoxy (-CH₂O-), tetrazole (CN₄), sulfonamido (-SO₂NH-), methylenesulfonamido (-CHRSO₂NH-), reversed sulfonamide (-NHSO₂-), and backbones with malonate and/or gem-diamino-alkyl subunits, for example, as reviewed by Fletcher *et al.* ((1998) *Chem. Rev.* 98:763) and detailed by references cited therein. Many of the foregoing substitutions result in approximately isosteric polymer backbones relative to backbones formed from α -amino acids.

[0065] In each of the backbones provided above, sidechain groups can be appended that carry a positively charged group. For example, the sulfonamide-linked backbones (-SO₂NH- and -NHSO₂-) can have sidechain groups attached to the nitrogen atoms. Similarly, the hydroxyethylene (-CH(OH)CH₂-) linkage can bear a sidechain group attached to the hydroxy substituent. One of skill in the art can readily adapt the other linkage chemistries to provide positively charged sidechain groups using standard synthetic methods.

[0066] In a particularly preferred embodiment, the positively charged backbone is a polypeptide having branching groups (also referred to as efficiency groups) comprising -(gly)_{n1}-(arg)_{n2}, HIV-TAT or fragments thereof, or the protein transduction domain of Antennapedia, or a fragment thereof, in which the subscript n1 is an integer of from 0 to 20, more preferably 0 to 8, still more preferably 2 to 5, and the subscript n2 is independently an odd integer of from about 5 to about 25, more preferably about 7 to about 17, most preferably about 7 to about 13. Still further preferred are those embodiments in which the HIV-TAT fragment has the formula (gly)_p-RGRDDRRQRRR-(gly)_q, (gly)_p-YGRKKRRQRRR-(gly)_q or (gly)_p-RKKRRQRRR-(gly)_q wherein the subscripts p and q are each independently an integer of from 0 to 20 and the fragment is attached to the backbone via either the C-terminus or the

N-terminus of the fragment. Preferred HIV-TAT fragments are those in which the subscripts p and q are each independently integers of from 0 to 8, more preferably 2 to 5. In another preferred embodiment the positively charged side chain or branching group is the Antennapedia (Antp) protein transduction domain (PTD), or a fragment thereof that retains activity. Preferably the positively charged carrier includes side-chain positively charged branching groups in an amount of at least about 0.05 %, as a percentage of the total carrier weight, preferably from about 0.05 to about 45 weight %, and most preferably from about 0.1 to about 30 weight %. For positively charged branching groups having the formula —(gly)_{n1}-(arg)_{n2}, the most preferred amount is from about 0.1 to about 25 %.

[0067] In another particularly preferred embodiment, the backbone portion is a polylysine and positively charged branching groups are attached to the lysine sidechain amino groups. The polylysine used in this particularly preferred embodiment has a molecular weight of from about 10,000 to about 1,500,000, preferably from about 25,000 to about 1,200,000, and most preferably from about 100,000 to about 1,000,000. It can be any of the commercially available (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA) polylysines such as, for example, polylysine having MW > 70,000, polylysine having MW of 70,000 to 150,000, polylysine having MW 150,000 to 300,000 and polylysine having MW > 300,000. The selection of an appropriate polylysine will depend on the remaining components of the composition and will be sufficient to provide an overall net positive charge to the composition and provide a length that is preferably from one to four times the combined length of the negatively charged components. Preferred positively charged branching groups or efficiency groups include, for example, -gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg (-Gly₃Arg₇) or HIV-TAT. In another preferred embodiment the positively charged backbone is a long chain polyalkyltneimine such as a polyethyleneimine, for example, one having a molecular weight of about 1,000,000.

[0068] The positively charged backbones or carrier molecules comprising polypeptides or polyalkyleneimines, having the branching groups described above, are novel compounds and form an aspect of this invention.

[0069] In one embodiment of the invention, only a positively charged carrier that has positively charged branching groups is necessary for transdermal delivery of the active substance (e.g. a biologically active agent, or imaging/targeting agent). In one embodiment of this case the positively charged carrier is a polypeptide (e.g., lysine, arginine, ornithine,

homoarginine, and the like) having multiple positively charged side-chain groups, as described above. Preferably, the polypeptide has a molecular weight of at least about 10,000. In another embodiment, the positively charged carrier is a nonpeptidyl polymer such as a polyalkyleneimine having multiple positively charged side-chain groups having a molecular weight of at least about 100,000. Such polyalkyleneimines include polyethylene- and polypropyleneimines. In either instance, for use as the sole necessary agent for transdermal delivery the positively charged carrier molecule includes positively charged branching or efficiency groups, comprising $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, in which the subscript $n1$ is an integer of from 0 to 20 more preferably 0 to 8, still more preferably 2 to 5, and the subscript $n2$ is independently an odd integer of from about 5 to about 25, more preferably from about 7 to about 17, and most preferably from about 7 to about 13, HIV-TAT or fragments thereof, or Antennapedia PTD or a fragment thereof. Preferably the side-chain or branching groups have the general formula $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ as described above. Other preferred embodiments are those in which the branching or efficiency groups are HIV-TAT fragments that have the formula $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR}-(\text{gly})_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR}-(\text{gly})_q$, or $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR}-(\text{gly})_q$, wherein the subscripts p and q are each independently an integer of from 0 to 20 and the fragment is attached to the carrier molecule via either the C-terminus or the N-terminus of the fragment. The side branching groups can have either the D- or L-form (R or S configuration) at the center of attachment. Preferred HIV-TAT fragments are those in which the subscripts p and q are each independently integers of from 0 to 8, more preferably 2 to 5. Other preferred embodiments are those in which the branching groups are Antennapedia PTD groups or fragments thereof that retain the group's activity. These are known in the art, for instance, from Console et al., J. Biol. Chem. 278:35109 (2003).

[0070] In a particularly preferred embodiment, the carrier is a polylysine with positively charged branching groups attached to the lysine side-chain amino groups. The polylysine used in this particularly preferred embodiment can be any of the commercially available (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA, e.g.) polylysines such as, for example, polylysine having MW > 70,000, polylysine having MW of 70,000 to 150,000, polylysine having MW 150,000 to 300,000 and polylysine having MW > 300,000. However, preferably the polylysine has MW of at least about 10,000. Preferred positively charged branching groups or efficiency groups include, for example, $-\text{gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-}$

arg-arg-arg (-Gly₃Arg₇), HIV-TAT or fragments of it, and Antennapedia PTD or fragments thereof.

Other components

[0071] In addition to the positively charged backbone component, the multicomponent compositions of the present invention comprise at least one component from the following:

- i) a first negatively-charged backbone having a plurality of attached imaging moieties, or a plurality of negatively-charged imaging moieties;
- ii) a second negatively-charged backbone having a plurality of attached targeting agents, or a plurality of negatively-charged targeting moieties;
- iii) a non-protein non-nucleotide biologically active agent
- iv) a therapeutic protein other than insulin, botulinum toxins, VEGF and antibody fragments.

[0072] In a related aspect, as described herein, in some embodiments or compositions of this invention, the positively charged backbone or carrier may be used alone to provide transdermal delivery of certain types of substances. Combinations of biologically active agents as described herein such as, for example, combinations of non-nucleotide non-protein therapeutics such as antifungal agents or proteins other than insulin, botulinum toxins, VEGF and antibody fragments (particularly those having a molecular weight of less than 20,000 kD), and antigenic agents suitable for immunization can also be employed in these compositions. In a related aspect of the invention, some embodiments or compositions will include an imaging agent such as an agent suitable for magnetic resonance imaging or optical imaging. These embodiments or compositions may, for example, afford topical delivery of an optical imaging agent for melanoma.

[0073] The negatively-charged backbones, when used to carry the imaging moieties, targeting moieties and therapeutic agents, can be a variety of backbones (similar to those described above) having multiple groups carrying a negative charge at physiological pH. Alternatively, the imaging moieties, targeting moieties and therapeutic agents with sufficient surface negatively charged moieties will not require attachment of an additional backbone for ionic complexation with the positively-charged backbones as will be readily apparent to one skilled in the art. "Sufficient" in this context implies that a suitable density of negatively-charged groups is present on the surface of the imaging moieties, targeting moieties or

therapeutic agents to afford an ionic attraction with the positively-charged backbones described above. In these cases, the substance or a derivative thereof has sufficient negative charge to associate with the positively charged carriers of the present invention non-covalently. Alternatively, other uncharged moieties can be employed to at sufficient density to afford non-ionic, non-covalent association with the carrier backbones of the present invention, as will be apparent to one skilled in the art. The term "sufficient" in the context of ionic or non-ionic non-covalent interactions can be determined for example by a change in particle sizing or functional spectrophotometry versus the components alone. Suitable negatively-charged groups are carboxylic acids, phosphinic, phosphonic or phosphoric acids, sulfinic or sulfonic acids, and the like. In other embodiments, the negatively-charged backbone is an oligosaccharide (e.g., dextran). In still other embodiments, the negatively-charged backbone is a polypeptide (e.g., poly glutamic acid, poly aspartic acid, or a polypeptide in which glutamic acid or aspartic acid residues are interrupted by uncharged amino acids). The moieties described in more detail below (imaging moieties, targeting agents, and therapeutic agents) can be attached to a backbone having these pendent groups, typically via ester linkages. Alternatively, amino acids which interrupt negatively-charged amino acids or are appended to the terminus of the negatively-charged backbone, can be used to attach imaging moieties and targeting moieties via, for example, disulfide linkages (through a cysteine residue), amide linkages, ether linkages (through serine or threonine hydroxyl groups) and the like.

[0074] The imaging moieties and targeting moieties can themselves be small anions in the absence of a negatively charged polymer. The imaging moieties, targeting moieties and therapeutic agents can also be themselves covalently modified to afford sufficient surface negatively charged moieties for ionic complexation with the positively-charged backbones as will be readily apparent to one skilled in the art. In both of these cases, the substance or a derivative thereof has sufficient negative charge to associate with the positively charged carriers of the present invention non-covalently. The term "sufficient" in this context refers to an association that can be determined for example by change in particle sizing or functional spectrophotometry versus the components a

Imaging moieties

[0075] A variety of diagnostic or imaging moieties are useful in the present invention and are present in an effective amount that will depend on the condition being diagnosed or

imaged, the route of administration, the sensitivity of the agent, device used for detection of the agent, and the like.

[0076] Examples of suitable imaging or diagnostic agents include radiopaque contrast agents, paramagnetic contrast agents, superparamagnetic contrast agents, optical imaging moieties, CT contrast agents and other contrast agents. For example, radiopaque contrast agents (for X-ray imaging) will include inorganic and organic iodine compounds (e.g., diatrizoate), radiopaque metals and their salts (e.g., silver, gold, platinum and the like) and other radiopaque compounds (e.g., calcium salts, barium salts such as barium sulfate, tantalum and tantalum oxide). Suitable paramagnetic contrast agents (for MR imaging) include gadolinium diethylene triaminopentaacetic acid (Gd-DTPA) and its derivatives, and other gadolinium, manganese, iron, dysprosium, copper, europium, erbium, chromium, nickel and cobalt complexes, including complexes with 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N''-triacetic acid (DO3A), 1,4,7-triazacyclononane-N,N',N''-triacetic acid (NOTA), 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (TETA), hydroxybenzylethylene-diamine diacetic acid (HBED) and the like. Suitable superparamagnetic contrast agents (for MR imaging) include magnetites, superparamagnetic iron oxides, monocrystalline iron oxides, particularly complexed forms of each of these agents that can be attached to a negatively charged backbone. Still other suitable imaging agents are the CT contrast agents including iodinated and noniodinated and ionic and nonionic CT contrast agents, as well as contrast agents such as spin-labels or other diagnostically effective agents. Suitable optical imaging agents include, for example, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, Oregon green 488, Oregon green 500, Oregon green 514, Green fluorescent protein, 6-FAM, Texas Red, Hex, TET, and HAMRA.

[0077] Other examples of diagnostic agents include markers. A wide variety of markers or labels may be employed, such as radionuclides, fluors, enzymes, enzyme substrates, enzyme cofactors, enzyme inhibitors, ligands (particularly haptens), and the like. Still other useful substances are those labeled with radioactive species or components, such as ^{99m}Tc glucoheptonate.

[0078] The election to attach an imaging moiety to a negatively charged backbone will depend on a variety of conditions. Certain imaging agents are neutral at physiological pH and will preferably be attached to a negatively-charged backbone or covalently modified

to include sufficient negatively-charged moieties to form a complex with the positively-charged carrier. Other imaging agents carry sufficient negative charge to form a complex with the positively-charged carrier, even in the absence of a negatively-charged backbone. In these cases, the substance or a derivative thereof has sufficient negative charge to associate with the positively charged carriers of the present invention non-covalently. The term "sufficient" in this context refers to an association that can be determined, for example, by change in particle sizing or functional spectrophotometry versus the components alone. An example of a negatively-charged imaging moiety is phosphate ion, which is useful for magnetic resonance imaging.

Targeting agents

[0079] A variety of targeting agents are useful in the compositions described herein. Typically, the targeting agents are attached to a negatively-charged backbone as described for the imaging moieties above. The targeting agents can be any element that makes it possible to direct a therapeutic agent or another component of the composition to a particular site or to alter the tropism of the complex relative to that of the complex without the targeting agent. The targeting agent can be an extracellular targeting agent. Such an agent can also be an intracellular targeting agent, allowing a therapeutic agent to be directed towards particular cell compartments (e.g., mitochondria, nucleus, and the like). The agent most simply can be a small anion which, by virtue of changing the net charge distribution, alters the tropism of the complex from more highly negative cell surfaces and extracellular matrix components to a wider variety of cells or even specifically away from the most highly negative surfaces.

[0080] The targeting agent or agents are preferably linked, covalently or non-covalently, to a negatively-charged backbone according to the invention. According to a preferred mode of the invention, the targeting agent is covalently attached to polyaspartate, sulfated or phosphorylated dextran, and the like that serves as a negatively-charged backbone component, preferably via a linking group. In one group of embodiments, the targeting agent is a fusogenic peptide for promoting cellular transfection (i.e., for favoring the passage of the composition or its various elements across membranes, or for helping in the egress from endosomes or for crossing the nuclear membrane). The targeting agent can also be a cell receptor ligand for a receptor that is present at the surface of the cell type, such as, for example, a sugar, transferrin, or asialo-orosomucoid protein.

[0081] Other useful targeting agents include sugars, peptides, hormones, vitamins, cytokines, small anions, lipids or sequences or fractions derived from these elements and which allow specific binding with their corresponding receptors. Preferably, the targeting agents are sugars and/or peptides cell receptor ligands or fragments thereof, receptors or receptor fragments, and the like. More preferably, the targeting agents are ligands of growth factor receptors, of cytokine receptors, or of cell lectin receptors or of adhesion protein receptors. The targeting agent can also be a sugar which makes it possible to target lectins such as the asialoglycoprotein receptors.

[0082] In still other embodiments, a targeting agent is used in the absence of a negatively-charged backbone. In this group of embodiments, the targeting agent carries sufficient negatively charged moieties to form an ionic complex with the positively-charged carrier described above. In these cases, the substance or a derivative thereof has sufficient negative charge to associate with the positively charged carriers of the present invention non-covalently. The term "sufficient" in this context refers to an association that can be determined for example by change in particle sizing or functional spectrophotometry versus the components alone. Suitable negatively-charged targeting agents for this group of embodiments are protein-based targeting agents having a net negative charge at physiological pH, as well as targeting agents that can facilitate adhesion to a particular cell surface, such as small polyanions (e.g., phosphate, aspartate and citrate) which may change targeting based upon net surface charge of the cell to be targeted.

Biologically active agents

[0083] A variety of biologically active agents, including both therapeutic and cosmeceutical agents, are useful in the present invention and are present in an effective amount that will depend on the condition being treated, prophylactically or otherwise, the route of administration, the efficacy of the agent and patient's size and susceptibility to the treatment regimen.

[0084] As noted previously, the invention specifically excludes botulinum toxins, VEGF and antibody fragments when the term "therapeutic" or "biologically active protein" is employed. Moreover, the invention specifically excludes therapeutic proteins capable of achieving therapeutic alterations of blood glucose levels (e.g. to treat hyperglycemia), such as insulin. Since antigens suitable for immunization have other biological activities (such as mounting an immune response), these remain included in the appropriate aspects of this

invention, however. The antigenic agents suitable for immunization can be protein-based antigens which do not therapeutically alter blood glucose levels, non-protein non-nucleotide agents or hybrids thereof. Nucleotides encoding antigens are specifically not suitable for the compositions of the present invention, however. Thus, the agents included are themselves antigens suitable for immunization. Suitable antigens include, for example, those for environmental agents, pathogens or biohazards. Suitable antigenic agents preferably include, for example, antigens related treatments for malaria, rabies, anthrax, tuberculosis, or related to childhood immunizations such as hepatitis B, diphtheria, pertussis, tetanus, *Haemophilus influenza* type b, inactivated poliovirus, measles, mumps, rubella, varicella, pneumococcus, hepatitis A, and influenza.

[0085] Suitable therapeutic agents that can be attached to a negatively charged backbone can be found in essentially any class of agents, including, for example, analgesic agents, anti-asthmatic agents, antibiotics, antidepressant agents, anti-diabetic agents, antifungal agents, antiemetics, antihypertensives, anti-impotence agents, anti-inflammatory agents, antineoplastic agents, anti-HIV agents, antiviral agents, anxiolytic agents, contraception agents, fertility agents, antithrombotic agents, prothrombotic agents, hormones, vaccines, immunosuppressive agents, vitamins and the like. Alternatively, sufficient negatively charged groups can be introduced into the therapeutic agent to afford ionic complexation with the positively charged backbones described above. Many suitable methods such as phosphorylation or sulfation exist as will be readily apparent to one skilled in the art.

[0086] Further, certain agents themselves possess adequate negatively-charged moieties to associate with the positively charged carrier described above and do not require attachment to a negatively charged backbone. In these cases, the substance or a derivative thereof has sufficient negative charge to associate with the positively charged carriers of the present invention non-covalently. The term "sufficient" in this context refers to an association that can be determined for example by change in particle sizing or functional spectrophotometry versus the components alone.

[0087] Suitable cosmeceutic agents include, for example, epidermal growth factor (EGF), as well as human growth hormone, and antioxidants.

[0088] More particularly, therapeutic agents useful in the present invention include such analgesics as lidocaine, novocaine, bupivacaine, procaine, tetracaine, benzocaine, cocaine, mepivacaine, etidocaine, proparacaine ropivacaine, prilocaine and the like; anti-

asthmatic agents such as azelastine, ketotifen, traxanox, corticosteroids, cromolyn, nedocromil, albuterol, bitolterol mesylate, pirbuterol, salmeterol, terbutaline, theophylline and the like; antibiotic agents such as neomycin, streptomycin, chloramphenicol, norfloxacin, ciprofloxacin, trimethoprim, sulfamethyloxazole, the β -lactam antibiotics, tetracycline, and the like; antidepressant agents such as nefopam, oxypertine, imipramine, trazadone and the like; anti-diabetic agents such as biguanidines, sulfonylureas, and the like; antiemetics and antipsychotics such as chlorpromazine, fluphenazine, perphenazine, prochlorperazine, promethazine, thiethylperazine, triflupromazine, haloperidol, scopolamine, diphenidol, trimethobenzamide, and the like; neuromuscular agents such as atracurium mivacurium, rocuronium, succinylcholine, doxacurium, tubocurarine; antifungal agents such as amphotericin B, nystatin, candicidin, itraconazole, ketoconazole, miconazole, clotrimazole, fluconazole, ciclopirox, econazole, naftifine, terbinafine, griseofulvin, ciclopirox and the like; antihypertensive agents such as propranolol, propafenone, oxyprenolol, nifedipine, reserpine and the like; anti-impotence agents such as nitric oxide donors and the like; anti-inflammatory agents including steroidal anti-inflammatory agents such as cortisone, hydrocortisone, dexamethasone, prednisolone, prednisone, fluazacort, and the like, as well as non-steroidal anti-inflammatory agents such as indomethacin, ibuprofen, ramifenizone, piroxicam and the like; antineoplastic agents such as adriamycin, cyclophosphamide, actinomycin, bleomycin, daunorubicin, doxorubicin, epirubicin, mitomycin, rapamycin, methotrexate, fluorouracil, carboplatin, carmustine (BCNU), cisplatin, etoposide, interferons, phenesterine, taxol (including analogs and derivatives), camptothecin and derivatives thereof, vinblastine, vincristine and the like; anti-HIV agents (e.g., antiproteolytics); antiviral agents such as amantadine, methisazone, idoxuridine, cytarabine, acyclovir, famciclovir, ganciclovir, foscarnet, sorivudine, trifluridine, valacyclovir, cidofovir, didanosine, stavudine, zalcitabine, zidovudine, ribavirin, rimantadine and the like; anxiolytic agents such as dantrolene, diazepam and the like; COX-2 inhibitors; contraception agents such as progestogen and the like; anti-thrombotic agents such as GPIIb/IIIa inhibitors, tissue plasminogen activators, streptokinase, urokinase, heparin and the like; prothrombotic agents such as thrombin, factors V, VII, VIII and the like; hormones such as growth hormone, prolactin, EGF (epidermal growth factor) and the like; immunosuppressive agents such as cyclosporine, azathioprine, mizoribine, FK506, prednisone and the like; vitamins such as A, D, E, K and the like; and other therapeutically or medicinally active agents. See, for

example, GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, Ninth Ed. Hardman, et al., eds. McGraw-Hill, (1996).

[0089] In the most preferred embodiments, the biological agent is selected from protein having a molecular weight of less than 20,000 kD and other biologically active agents such as, for example, a non-protein non-nucleotide therapeutic agent such as certain antifungals, and antigenic agents for immunization. As in all aspects of the present invention, suitable examples specifically excludes insulin, botulinum toxins, VEGF and antibody fragments.

[0090] As noted above for the targeting agents and imaging agents, certain biological or cosmeceutical agents can be used in the absence of a negatively-charged backbone. Such biological or cosmeceutical agents are those that generally carry a net negative charge at physiological pH to form a complex with the positively-charged carrier. Examples include antigens for immunization which typically include proteins or glycoproteins, and many antifungal agents, as well as agents for targeted imaging of melanoma with or without an inherent therapeutic potential. In these cases, the substance or a derivative thereof has sufficient negative charge to associate with the positively charged carriers of the present invention non-covalently. The term "sufficient" in this context refers to an association that can be determined for example by change in particle sizing or functional spectrophotometry versus the components alone.

Negatively-charged backbones having attached imaging moieties, targeting agents or therapeutic agents

[0091] For three of the above groups of components, including imaging moieties, targeting agents and therapeutic agents, the individual compounds are attached to a negatively charged backbone, covalently modified to introduce negatively-charged moieties, or employed directly if the compound contains sufficient negatively-charged moieties to confer ionic complexation to the positively charged backbone described above. When necessary, typically, the attachment is via a linking group used to covalently attach the particular agent to the backbone through functional groups present on the agent as well as the backbone. A variety of linking groups are useful in this aspect of the invention. See, for example, Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, CA (1996); Wong, S.S., Ed., *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press, Inc.,

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

[0092] In some embodiments, the therapeutic, diagnostic or targeting agents will not have an available functional group for attaching to a linking group, and can be first modified to incorporate, for example, a hydroxy, amino, or thiol substituent. Preferably, the substituent is provided in a non-interfering portion of the agent, and can be used to attach a linking group, and will not adversely affect the function of the agent.

[0093] In yet another aspect, the present invention provides compositions comprising a non-covalent complex of a positively-charged backbone having at least one attached efficiency group and in this aspect of the invention, the positively-charged backbone can be essentially any of the positively-charged backbones described above, and will also comprise (as with selected backbones above) at least one attached efficiency group. Suitable efficiency groups include, for example, (Gly)_{n1}-(Arg)_{n2} wherein the subscript n1 is an integer of from 3 to about 5, and the subscript n2 is independently an odd integer of from about 7 to about 17; or TAT domains. For example, the TAT domains may have the formula (gly)_p-RGRDDRRQRRR-(gly)_q, (gly)_p-YGRKKRRQRRR-(gly)_q, or (gly)_p-RKKRRQRRR-(gly)_q, wherein the subscripts p and q are each independently an integer of from 0 to 20 and the fragment is attached to the carrier molecule via either the C-terminus or the N-terminus of the fragment. The side branching groups can have either the D- or L-form (R or S configuration) at the center of attachment. Preferred HIV-TAT fragments are those in which the subscripts p and q are each independently integers of from 0 to 8, more preferably 2 to 5.

Transdermal delivery of certain other molecules

[0094] It has been found that the positively charged carriers as discussed above can be used for transdermal delivery of proteins and other biologically active agents (e.g., proteins having a molecular weight of less than 20,000 kD, non-protein non-nucleotide therapeutic agents such as certain antifungal agents, or antigenic agents for immunization). The use of the positively charged carrier enables transmission of the protein or marker gene both into and out of skin cells, and delivery of it in an effective amount and active form to an underlying tissue. Local delivery in this manner could afford dosage reductions, reduce toxicity and allow more precise dosage optimization for desired effects relative to injectable or implantable materials, particularly in the case of antifungal agents, antigenic agents

suitable for immunization, or agents for molecular imaging of skin disorders such as melanoma for example. This embodiment may include a quantity of a small preferably polyvalent anions, (e.g, phosphate, aspartate, or citrate), or may be carried out in the substantial absence of such a polyanion.

[0095] Similarly, the term "protein" includes protein extracted from natural sources, as well as protein that may be obtained synthetically, via chemical or recombinant means. The protein also may be in a modified form or in the form of, e.g. a recombinant peptide, a fusion protein, or a hybrid molecule. The protein in in some cases may be a portion of a larger protein molecule that possesses the necessary activity. Preferable proteins are those having a molecular weight of less than 20,000 kD [e.g., those that may be used in transdermal compositions and methods, such as antigens for immunization], which can vary widely in physiochemical properties. Likewise non-protein non-nucleotide therapeutic agents, including antifungal agents, may be obtained from natural sources or may be synthesized.

[0096] Compositions of this invention are preferably in the form of products to be applied to the skin or epithelium of subjects or patients (i.e. humans or other mammals in need of the particular treatment). The term "in need" is meant to include both pharmaceutical and health-related needs as well as needs that tend to be more cosmetic, aesthetic, or subjective. The compositions may also be used, for example, for altering or improving the appearance of facial tissue.

[0097] In general, the compositions are prepared by mixing proteins particularly those having a molecular weight of less than 20,000 kD or other biologically active agent such as for example, a non-protein non-nucleotide therapeutic agent or alternately an agent for immunization to be administered with the positively charged carrier, and usually with one or more additional pharmaceutically acceptable carriers or excipients. In their simplest form they may contain a simple aqueous pharmaceutically acceptable carrier or diluent, such as saline, which may be buffered. However, the compositions may contain other ingredients typical in topical pharmaceutical or cosmeceutical compositions, including a dermatologically or pharmaceutically acceptable carrier, vehicle or medium (i.e. a carrier, vehicle or medium that is compatible with the tissues to which they will be applied). The term "dermatologically or pharmaceutically acceptable," as used herein, means that the compositions or components thereof are suitable for use in contact with these tissues or for use in patients in general without undue toxicity, incompatibility, instability, allergic

response, and the like. As appropriate, compositions of the invention may comprise any ingredient conventionally used in the fields under consideration, and particularly in cosmetics and dermatology. In all aspects of the present invention, the association between the carrier and the biologically active agent is by non-covalent interaction, which can include, for example, ionic interactions, hydrogen bonding, van der Waals forces, or combinations thereof.

[0098] The compositions may be pre-formulated or may be prepared at the time of administration, for example, by providing a kit for assembly at or prior to the time of administration. Alternatively, as mentioned above, the therapeutic proteins and the positively charged backbone may be administered in separate form to the patient, for example by providing a kit that contains a skin patch or other dispensing device containing the therapeutic protein and a liquid, gel, cream or the like that contains the positively charged carrier (and optionally other ingredients). In that particular embodiment the combination is administered by applying the liquid or other composition containing the carrier to the skin, followed by application of the skin patch or other device.

[0099] The compositions of the invention are applied so as to administer an effective amount of a therapeutic proteins or other beneficial substance, such as an imaging or targeting agent. For transdermal delivery the term "effective amount" refers to any composition or method that provides greater transdermal delivery of the biologically active agent relative to the agent in the absence of the carrier. For antigens, "effective amount" refers to an amount sufficient to allow a subject to mount an immune response to the antigen after application or a series of applications of the antigen. For antifungal agents, "effective amount" refers to an amount sufficient to reduce symptoms or signs of fungal infection. For other biologically active agents which do not therapeutically alter blood glucose levels, "effective amount" refers to an amount sufficient to exert the defined biologic or therapeutic effect characterized for that agent in, for example, the Physicians' Desk Reference or the like without inducing significant toxicity. The invention specifically excludes antibody fragments when the term "therapeutic" or "biologically active protein" is employed. Since antigens suitable for immunization have other biological activities such as mounting an immune response, these remain included in the appropriate aspects of this invention, however.

[0100] The compositions may contain an appropriate effective amount of a therapeutic protein or other biologically active agent for application as a single-dose

treatment, or may be more concentrated, either for dilution at the place of administration or for use in multiple applications. In general, compositions containing proteins (particularly those having a molecular weight of less than 20,000 kD) or other biologically active agents will contain from about 1×10^{-20} to about 25 weight % of the biologically active agent and from about 1×10^{-19} to about 30 weight % of the positively charged carrier. In general, compositions containing a non-protein non-nucleotide therapeutic agent or alternately an agent for immunization will contain from about 1×10^{-10} to about 49.9 weight % of the antigen and from about 1×10^{-9} to about 50 weight % of the positively charged carrier. The amount of carrier molecule or the ratio of it to the biologically active agent will depend on which carrier is chosen for use in the composition in question. The appropriate amount or ratio of carrier molecule in a given case can readily be determined, for example, by conducting one or more experiments such as those described below.

[0101] Compositions of this invention may include solutions, emulsions (including microemulsions), suspensions, creams, lotions, gels, powders, or other typical solid or liquid compositions used for application to skin and other tissues where the compositions may be used. Such compositions may contain, in addition to biologically active agents and the carrier molecule, other ingredients typically used in such products, such as antimicrobials, moisturizers and hydration agents, penetration agents, preservatives, emulsifiers, natural or synthetic oils, solvents, surfactants, detergents, gelling agents, emollients, antioxidants, fragrances, fillers, thickeners, waxes, odor absorbers, dyestuffs, coloring agents, powders, viscosity-controlling agents and water, and optionally including anesthetics, anti-itch additives, botanical extracts, conditioning agents, darkening or lightening agents, glitter, humectants, mica, minerals, polyphenols, silicones or derivatives thereof, sunblocks, vitamins, and phytomedicinals.

[0102] Compositions according to this invention may be in the form of controlled-release or sustained-release compositions, wherein the proteins substance to be delivered and the carrier are encapsulated or otherwise contained within a material such that they are released onto the skin in a controlled manner over time. The substance to be delivered and the carrier may be contained within matrixes, liposomes, vesicles, microcapsules, microspheres and the like, or within a solid particulate material, all of which are selected and/or constructed to provide release of the substance or substances over time. The

therapeutic substance and the carrier may be encapsulated together (e.g., in the same capsule) or separately (in separate capsules).

[0103] Administration of the compositions of this invention to a subject is, of course, another aspect of the invention.

[0104] Administration by skin patches and the like, with controlled release and/or monitoring is likely to be a common method, so the composition of this invention often will be provided as contained in a skin patch or other device. In the case of antigens suitable for immunizations, most preferably the compositions are administered by or under the direction of a physician or other health professional. They may be administered in a single treatment or in a series of periodic treatments over time. For transdermal delivery of antigens suitable for immunizations for the purposes mentioned above, a composition as described above is applied topically to the skin or to a nail plate and surrounding skin. Similarly, in the case of non-protein non-nucleotide therapeutics such as antifungal agents, preferably the compositions are administered under the direction of a physician or other health professional. They may be administered in a single treatment or in a series of periodic treatments over time. For transdermal delivery of therapeutic proteins a composition as described above is applied topically to the skin.

[0105] Kits for administering the compositions of the inventions, either under direction of a health care professional or by the patient or subject, may also include a custom applicator suitable for that purpose. In the case of an applicator to the finger nail or toe nail plate or surrounding anatomic structures, such a custom applicator can include for example a prosthetic nail plate, a lacquer, a nail polish with a color agent, a gel, or a combination of any or all of these.

[0106] In another aspect, the invention relates to methods for the topical administration of the combination of the positively charged carrier described above with an effective amount of a biologically active agent (e.g., a proteins with a molecular weight of less than 20,000 kD, antigens suitable for immunization, antifungal agents or a non-protein, non-nucleotide therapeutic agent). As described above, the administration can be effected by the use of a composition according to the invention that contains appropriate types and amounts of these two substances specifically carrier and biologically active agent. However, the invention also includes the administration of these two substances in combination, though not necessarily in the same composition. For example, the therapeutic substance may be

incorporated in dry form in a skin patch or other dispensing device and the positively charged carrier may be applied to the skin surface before application of the patch so that the two act together, resulting in the desired transdermal delivery. In that sense, the two substances (carrier and biologically active agent) act in combination or perhaps interact to form a composition or combination in situ.

Methods of Preparing the Compositions

[0107] In another aspect, the present invention provides a method for preparing a pharmaceutical composition, the method comprising combining a positively charged backbone component and at least one member selected from:

- i) a first negatively-charged backbone having a plurality of attached imaging moieties, or a plurality of negatively-charged imaging moieties;
- ii) a second negatively-charged backbone having a plurality of attached targeting agents, or a plurality of negatively-charged targeting moieties;
- iii) a non-protein non-nucleotide biologically active agent
- iv) a therapeutic protein other than insulin, botulinum toxins, VEGF, or antibody fragments with a pharmaceutically acceptable carrier to form a non-covalent complex having a net positive charge.

[0108] In some embodiments of this invention, the positively charged backbone or carrier may be used alone to provide transdermal delivery of certain types of substances. Here, preferred are compositions and methods comprising about 1×10^{-20} to about 25 weight % of the biologically active agent and from about 1×10^{-19} to about 30 weight % of the positively charged carrier. Also preferred are compositions and methods containing a non-nucleotide, non-protein therapeutic such as an antifungal agent, selective imaging agents for diagnosis of skin disorders such as melanoma, or an antigenic agent suitable for immunization, where the compositions and methods contain from 1×10^{-10} to about 49.9 weight % of the antigen and from about 1×10^{-9} to about 50 weight % of the positively charged carrier.

[0109] The broad applicability of the present invention is illustrated by the ease with which a variety of pharmaceutical compositions can be formulated. Typically, the compositions are prepared by mixing the positively charged backbone component with the desired components of interest (e.g., targeting, imaging or therapeutic components) in ratios and a sequence to obtain compositions having a variable net positive charge. In many

embodiments, the compositions can be prepared, for example, at bedside using pharmaceutically acceptable carriers and diluents for administration of the composition. Alternatively, the compositions can be prepared by suitable mixing of the components and then lyophilized and stored (typically at room temperature or below) until used or formulated into a suitable delivery vehicle.

[0110] The compositions can be formulated to provide mixtures suitable for various modes of administration, non-limiting examples of which include topical, cutaneous, oral, rectal, vaginal, parenteral, intranasal, intravenous, intramuscular, subcutaneous, intraocular, and transdermal. The pharmaceutical compositions of the invention preferably contain a vehicle which is pharmaceutically acceptable for an injectable formulation, in particular for direct injection into the desired organ, or for topical administration (to skin and/or mucous membrane). The pharmaceutical compositions may in particular be sterile, isotonic solutions or dry compositions (e.g., freeze-dried compositions), which may be reconstituted by the addition of sterilized water or physiological saline, to prepare injectable solutions.

[0111] Alternatively, when the compositions are to be applied topically (e.g., when transdermal delivery is desired) the component or components of interest can be applied in dry form to the skin (e.g., via by using a skin patch), where the skin is separately treated with the positively charged backbone or carrier. In this manner the overall composition is essentially formed in situ and administered to the patient or subject.

Methods of Using the Compositions

Delivery methods

[0112] The compositions of the present invention can be delivered to a subject, cell or target site, either *in vivo* or *ex vivo* using a variety of methods. In fact, any of the routes normally used for introducing a composition into ultimate contact with the tissue to be treated can be used. Preferably, the compositions will be administered with pharmaceutically acceptable carriers. Suitable methods of administering such compounds are available and well known to those of skill in the art. Although more than one route can be used to administer a particular composition, a particular route can often provide a more immediate and more effective reaction than another route. Pharmaceutically acceptable carriers are determined in part by the particular composition being administered, as well as by the particular method used to administer the composition. Accordingly, there is a wide variety of

suitable formulations of pharmaceutical compositions of the present invention (*see, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed. 1985).

[0113] Administration can be, for example, intravenous, topical, intraperitoneal, subdermal, subcutaneous, transcutaneous, intramuscular, oral, intra-joint, parenteral, intranasal, or by inhalation. Suitable sites of administration thus include, but are not limited to, the skin, bronchium, gastrointestinal tract, eye and ear. The compositions typically include a conventional pharmaceutical carrier or excipient and can additionally include other medicinal agents, carriers, adjuvants, and the like. Preferably, the formulation will be about 5% to 75% by weight of a composition of the invention, with the remainder consisting of suitable pharmaceutical excipients. Appropriate excipients can be tailored to the particular composition and route of administration by methods well known in the art (*see, e.g., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18TH ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)*).

[0114] The formulations can take the form of solid, semi-solid, lyophilized powder, or liquid dosage forms, such as, for example, tablets, pills, capsules, powders, solutions, suspensions, emulsions, suppositories, retention enemas, creams, ointments, lotions, aerosols or the like. In embodiments where the pharmaceutical composition takes the form of a pill, tablet or capsule, the formulation can contain, along with the biologically active composition, any of the following: a diluent such as lactose, sucrose, dicalcium phosphate, and the like; a disintegrant such as starch or derivatives thereof; a lubricant such as magnesium stearate and the like; and a binder such as starch, gum acacia, polyvinylpyrrolidone, gelatin, cellulose and derivatives thereof. Compositions can be presented in unit-dose or multi-dose sealed containers, such as ampoules or vials. Doses administered to a patient should be sufficient to achieve a beneficial therapeutic response in the patient over time.

[0115] In some embodiments, a sustained-release formulation can be administered to an organism or to cells in culture and can carry the desired compositions. The sustained-release composition can be administered to the tissue of an organism, for example, by injection. By "sustained-release", it is meant that the composition is made available for uptake by surrounding tissue or cells in culture for a period of time longer than would be achieved by administration of the composition in a less viscous medium, for example, a saline solution.

[0116] The compositions, alone or in combination with other suitable components, can be made into aerosol formulations (i.e., they can be "nebulized") to be administered via inhalation. Aerosol formulations can be placed into pressurized acceptable propellants, such as dichlorodifluoromethane, propane, nitrogen, and the like. For delivery by inhalation, the compositions can also be delivered as dry powder (e.g., Nektar).

[0117] Formulations suitable for parenteral administration, such as, for example, by intravenous, intramuscular, intradermal, and subcutaneous routes, include aqueous and non-aqueous, isotonic sterile injection solutions, which can contain antioxidants, buffers, bacteriostats, and solutes that render the formulation isotonic and compatible with the blood of the intended recipient, and aqueous and non-aqueous sterile suspensions that can include suspending agents, solubilizers, thickening agents, stabilizers, and preservatives.

[0118] Other methods of administration include, but are not limited to, administration using angioplastic balloons, catheters, and gel formations. Methods for angioplastic balloon, catheter and gel formation delivery are well known in the art.

Imaging methods

[0119] One of skill in the art will understand that the compositions of the present invention can be tailored for a variety of imaging uses. In one embodiment, virtual colonoscopy can be performed using the component-based system for imaging. At present, virtual colonoscopy involves essentially infusing contrast into a colon and visualizing the images on CT, then reconstructing a 3-D image. Similar techniques could be employed for MR. However, feces, mucous, and air all serve as contrast barriers and can give an artificial surface to the colon wall reconstruction. Addition of a cellular-targeting contrast would help overcome these barriers to provide a true wall reconstruction and help avoid both false-positives and false-negatives. There are several ways that the component-based system could be applied here. Most simply, the cationic efficiency backbone could be applied with a single contrast agent, for example a CT, MR, or optical contrast agent. Thus, the cellular surface layer could be visualized and any irregularities or obstructions detailed in the image reconstruction. However, the component based system offers the additional option of adding a specific second agent. This agent could consist of a cationic efficiency backbone, a different imaging moiety, and targeting components, for example targeting two antigens characteristic of colon cancer. The imaging moieties from the simple to the diagnostic could be selected so that one was CT contrast and the other MR contrast, or so that both were MR

contrast with one being a T2 agent and the other a T1 agent. In this manner, the surface could be reconstructed as before, and any regions specific for a tumor antigen could be visualized and overlaid on the original reconstruction. Additionally, therapeutic agents could be incorporated into the targeted diagnostic system as well. Similar strategies could be applied to regional enteritis and ulcerative colitis (and again combined with therapy). Alternately, optical imaging moieties and detection methods could be employed, for example, in the case of melanoma diagnosis or management, preferably in conjunction with a fluorescent imaging moiety. In these embodiments, detection can be visual, image-aided or entirely image-based for example by darkfield image analysis.

EXAMPLES

Example 1

[0120] This example illustrates transdermal delivery of a very large complex, namely a plasmid containing the blue fluorescent protein (BFP) transgene, using a positively charged backbone or carrier of the invention.

Backbone selection:

[0121] The positively charged backbone was assembled by covalently attaching -Gly₃Arg₇ to polylysine MW 150,000 via the carboxyl of the terminal glycine to free amines of the lysine sidechains at a degree of saturation of 18% (i.e., 18 out of each 100 lysine residues is covalently attached to a -Gly₃Arg₇). The modified backbone was designated "KNR2" to denote a second size of the peptidyl carrier. The control polycation was unmodified polylysine (designated "K2", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) of the same size and from the same lot. An additional control polycation, Superfect® (Qiagen) which is an activated dendrimer-based agent, was selected as a reference for high in vitro transfection rates (i.e. simultaneous positive control and reference for state-of-the art efficiency versus toxicity in vitro).

Therapeutic agent selection:

[0122] An 8 kilobase plasmid (pSport-based template, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) containing the entire transgene for blue fluorescent protein (BFP) and partial flanking sequences driven by a cytomegalovirus (CMV) promoter was employed. BFP serves as an identifiable marker for cells that have been transfected, then transcribe and translate the gene and can be directly visualized (i.e. without additional staining) under fluorescence microscopy. Thus, only cells in which the complex has crossed both the plasma membrane and the nuclear membrane before payload delivery can have transgene expression. This particular plasmid has a molecular weight of approximately 2.64 million, and was thus selected to evaluate the delivery of very large therapeutics via these complexes.

Preparation of samples:

[0123] In each case, an excess of polycation was employed to assemble a final complex that has an excess of positive charge. Although increasing charge density increases size (i.e. more backbones present per complex), increase in efficiency factor density per

complex can offset these changes. Thus, an optimal may occur at low ratios (i.e. size-based) or at high ratios (i.e. density of efficiency-factor based) and both are evaluated here for KNR2. Optimal ratios for K2 efficiency and Superfect efficiency were selected based on manufacturers recommendation and prior reports on maximal efficiency. Nucleotide-therapeutic dose was standardized across all groups as was total volume and final pH of the composition to be evaluated in cell culture.

[0124] The following mixtures were prepared:

- 1) K2 at a 4:1 charge ratio to a 0.5 mg/mL solution of a plasmid expressing blue fluorescent protein driven by a CMV promoter.
- 2) KNR2 at a ratio of 15:1 to a 0.5 mg/mL solution of a plasmid expressing blue fluorescent protein driven by a CMV promoter.
- 3) KNR2 at a ratio of 10:1 to a 0.5 mg/mL solution of a plasmid expressing blue fluorescent protein driven by a CMV promoter.
- 4) KNR2 at a ratio of 4:1 to a 0.5 mg/mL solution of a plasmid expressing blue fluorescent protein driven by a CMV promoter.
- 5) KNR2 at a ratio of 1.25:1 to a 0.5 mg/mL solution of a plasmid expressing blue fluorescent protein driven by a CMV promoter.
- 6) Superfect according to the manufacturer's recommendation at a 5:1 charge ratio to a 0.5 mg/mL solution of a plasmid expressing blue fluorescent protein driven by a CMV promoter.

Cell culture protocols:

[0125] All cell culture experiments were performed by observers blinded to the identity of treatment groups. On a 6-well plate, 1.0 mL of each solution was added to 70 % confluent HA-VSMC primary human aortic smooth muscle cells (passage 21; ATCC, Rockville, MD) and grown in M-199 with 10% serum for 48 hours at 37 degrees Celsius and 10% CO₂. Untreated control wells were evaluated as well and each group was evaluated at n=5 wells per group.

Analysis of efficiency:

[0126] Low magnification photographs (10X total) of intact cell plates were obtained by blinded observers at 60 degrees, 180 degrees and 200 degrees from the top of each well using a Nikon E600 epi-fluorescence microscope with a BFP filter and plan apochromat lenses. Image Pro Plus 3.0 image analysis suite (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) was employed to determine the percent of total cell area that was positive. This result was

complex can offset these changes. Thus, an optimal may occur at low ratios (i.e. size-based) or at high ratios (i.e. density of efficiency-factor based) and both are evaluated here for KNR2. Optimal ratios for K2 efficiency and Superfect efficiency were selected based on manufacturers recommendation and prior reports on maximal efficiency. Nucleotide-therapeutic dose was standardized across all groups as was total volume and final pH of the composition to be evaluated in cell culture.

[0124] The following mixtures were prepared:

- 1) K2 at a 4:1 charge ratio to a 0.5 mg/mL solution of a plasmid expressing blue fluorescent protein driven by a CMV promoter.
- 2) KNR2 at a ratio of 15:1 to a 0.5 mg/mL solution of a plasmid expressing blue fluorescent protein driven by a CMV promoter.
- 3) KNR2 at a ratio of 10:1 to a 0.5 mg/mL solution of a plasmid expressing blue fluorescent protein driven by a CMV promoter.
- 4) KNR2 at a ratio of 4:1 to a 0.5 mg/mL solution of a plasmid expressing blue fluorescent protein driven by a CMV promoter.
- 5) KNR2 at a ratio of 1.25:1 to a 0.5 mg/mL solution of a plasmid expressing blue fluorescent protein driven by a CMV promoter.
- 6) Superfect according to the manufacturer's recommendation at a 5:1 charge ratio to a 0.5 mg/mL solution of a plasmid expressing blue fluorescent protein driven by a CMV promoter.

Cell culture protocols:

[0125] All cell culture experiments were performed by observers blinded to the identity of treatment groups. On a 6-well plate, 1.0 mL of each solution was added to 70 % confluent HA-VSMC primary human aortic smooth muscle cells (passage 21; ATCC, Rockville, MD) and grown in M-199 with 10% serum for 48 hours at 37 degrees Celsius and 10% CO₂. Untreated control wells were evaluated as well and each group was evaluated at n=5 wells per group.

Analysis of efficiency:

[0126] Low magnification photographs (10X total) of intact cell plates were obtained by blinded observers at 60 degrees, 180 degrees and 200 degrees from the top of each well using a Nikon E600 epi-fluorescence microscope with a BFP filter and plan apochromat lenses. Image Pro Plus 3.0 image analysis suite (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) was employed to determine the percent of total cell area that was positive. This result was

normalized to total cell area for each, and reported as efficiency of gene delivery (% of total cells expressing transgene at detectible levels).

Analysis of toxicity:

[0127] Wells were subsequently evaluated by blinded observers in a dye exclusion assay (viable cells exclude dye, while nonviable ones cannot), followed by solubilization in 0.4% SDS in phosphate buffered saline. Samples were evaluated in a Spectronic Genesys 5 UV/VIS spectrophotometer at 595 nm wavelength (blue) to quantitatively evaluate nonviable cells as a direct measure of transfection agent toxicity. Samples were standardized to identical cell numbers by adjusting concentrations to matching OD280 values prior to the OD595 measurements.

Data handling and statistical analysis:

[0128] Total positive staining was determined by blinded observer via batch image analysis using Image Pro Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) and was normalized to total cross-sectional area to determine percent positive staining for each. Mean and standard error were subsequently determined for each group with analysis of significance at 95% confidence in one way ANOVA repeated measures using Statview software (Abacus, Berkeley, CA).

Results:

Efficiencies:

Results for efficiencies are as follows (mean $\pm$ Standard Error):

- 1) $0.163 \pm 0.106 \%$
- 2) $10.642 \pm 2.195 \%$
- 3) $8.797 \pm 3.839 \%$
- 4) $15.035 \pm 1.098 \%$
- 5) $17.574 \pm 6.807 \%$
- 6) $1.199 \pm 0.573 \%$

Runs #4 and #5 exhibit statistically significant ($P < 0.05$ by one factor ANOVA repeated measures with Fisher PLSD and TUKEY-A posthoc testing) enhancement of gene delivery efficiency relative to both polylysine alone and Superfect.

Toxicities:

[0129] Mean toxicity data are as follows (reported in AU at OD595; low values, such as present with saline alone correlate with low toxicity, while higher values, such as present in condition 1 indicate a high cellular toxicity):

Saline - 0.057 A;

1) 3.460 A;

2) 0.251 A;

3) 0.291 A;

4) 0.243 A;

5) 0.297 A;

6) 0.337 A.

Conclusions:

[0130] A less toxic, more efficient gene delivery can be accomplished with a ratio of 1.25 to 4.0 of KNR2 to DNA than controls, even those of the current gold standard Superfect. This experiment confirms the capability to deliver quite large therapeutic complexes across membranes using this carrier.

Example 2

[0131] This example illustrates the transport of a large nucleotide across skin by a carrier of the invention after a single administration.

Backbone selection:

[0132] The positively charged backbone was assembled by covalently attaching -Gly₃Arg₇ to polylysine (MW 150,000) via the carboxyl of the terminal glycine to free amines of the lysine sidechains at a degree of saturation of 18% (i.e., 18 out of each 100 lysine residues is covalently attached to a -Gly₃Arg₇). The modified backbone was designated "KNR2" as before. The control polycation was unmodified polylysine (designated "K2", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) of the same size and from the same lot. An additional control polycation, Superfect (Qiagen) which is an activated dendrimer-based agent, was selected as a reference for high transfection rates (i.e. simultaneous positive control and reference for state-of-the art efficiency versus toxicity in vitro).

Therapeutic agent selection:

[0133] For the present experiment, an 8.5 kilobase plasmid (pSport-based template, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) containing the entire transgene for E. Coli beta-galactosidase (β gal) and partial flanking sequences driven by a cytomegalovirus (CMV) promoter was employed. Here β gal serves as an identifiable marker for cells which have been transfected, then transcribe and translate the gene and can be directly visualized after specific staining for the foreign enzyme. Thus, only cells in which the complex has crossed skin then reached the target cell and translocated across both the plasma membrane and the nuclear membrane before payload delivery can have transgene expression. This particular plasmid has a molecular weight of approximately 2,805,000.

Preparation of samples:

[0134] In each case, an excess of polycation is employed to assemble a final complex that has an excess of positive charge. Optimal ratios for K2 efficiency, KNR2 efficiency and Superfect efficiency were selected based on manufacturer's recommendation and prior in vitro experiments to determine maximal efficiency. Nucleotide-therapeutic dose was standardized across all groups as was total volume and final pH of the composition to be applied topically. Samples were prepared as follows:

Group labeled AK1: 8 micrograms of β gal plasmid (p/CMV-sport- β gal) per final aliquot (i.e. 80 micrograms total) and peptidyl carrier KNR2 at a charge ratio of 4:1 were mixed to homogeneity and diluted to 200 microliters with phosphate buffered saline. The resulting composition was mixed to homogeneity with 1.8 ml of Cetaphil moisturizer and aliquoted in 200 microliter portions for in vivo experiments.

Group labeled AL1: 8 micrograms of β gal plasmid (p/CMV-sport- β gal) per final aliquot (i.e. 80 micrograms total) and K2 at a charge ratio of 4:1 were mixed to homogeneity and diluted to 200 microliters with phosphate buffered saline. The resulting composition was mixed to homogeneity with 1.8 ml of Cetaphil and aliquoted in 200 microliter portions for in vivo experiments.

Group labeled AM1: 8 micrograms of β gal plasmid (p/CMV-sport- β gal) per final aliquot (i.e. 80 micrograms total) and Superfect at a charge ratio of 5:1 were mixed to homogeneity and diluted to 200 microliters with phosphate buffered saline. The

resulting composition was mixed to homogeneity with 1.8 ml of Cetaphil and aliquoted in 200 microliter portions for in vivo experiments.

Animal experiments to determine transdermal delivery efficiencies after single treatment with peptidyl carriers and nucleotide therapeutics:

[0135] Animals were anesthetized via inhalation of isoflurane during application of treatments. After being anesthetized, C57 black 6 mice (n=4 per group) had metered 200 microliter doses of the appropriate treatment applied to the cranial portion of dorsal back skin (selected because the mouse cannot reach this region with mouth or limbs). Animals did not undergo depilatory treatment. Animals were recovered in a controlled heat environment to prevent hypothermia and once responsive were provided food and water ad libitum overnight. Twenty-four hours post-treatment, mice were euthanized via inhalation of CO₂, and treated skin segments were harvested at full thickness by blinded observers. Treated segments were divided into three equal portions the cranial portion was fixed in 10% neutral buffered formalin for 12-16 hours then stored in 70% ethanol until paraffin embedding. The central portion was snap-frozen and employed directly for beta-galactosidase staining at 37 degrees Celsius on sections as previously described (Waugh, J.M., M. Kattash, J. Li, E. Yuksel, M.D. Kuo, M. Lussier, A.B. Weinfeld, R. Saxena, E.D. Rabinovsky, S. Thung, S.L.C. Woo, and S.M. Shenaq. Local Overexpression of Tissue Plasminogen Activator to Prevent Arterial Thrombosis in an in vivo Rabbit Model. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 96(3): 1065-1070. Also: Elkins CJ, Waugh JM, Amabile PG, Minamiguchi H, Uy M, Sugimoto K, Do YS, Ganaha F, Razavi MK, Dake MD. Development of a platform to evaluate and limit in-stent restenosis. Tissue Engineering 2002. Jun;8(3): 395-407). The treated caudal segment was snap frozen for solubilization studies.

Toxicity:

[0136] Toxicity was evaluated by dye exclusion on paired sections to those analyzed for efficiency above. Sections only underwent staining for either efficiency or for toxicity since the methods are not reliably co-employed. For toxicity analyses, the sections were immersed in exclusion dye for 5 minutes, then incubated at 37 degrees Celsius for 30 minutes at 10% CO₂. Any cells that did not exclude the dye in this period of time were considered non-viable.

Data handling and statistical analyses:

[0137] Data collection and image analysis were performed by blinded observers. Sections stained as above were photographed in their entirety on a Nikon E600 microscope with plan-apochromat lenses. Resulting images underwent batch image analysis processing using Image Pro Plus software as before with manual confirmation to determine number positive for beta-galactosidase enzyme activity (blue with the substrate method employed here) or cellular toxicity. These results were normalized to total cross-sectional number of cells by nuclear fast red staining for each and tabulated as percent cross-sectional positive staining. Subsequently, mean and standard error were subsequently determined for each group with analysis of significance at 95% confidence in one way ANOVA repeated measures using Statview software (Abacus, Berkeley, CA).

Results:

[0138] Results are summarized in the table below and illustrated in Figure 3. The positively charged peptidyl transdermal delivery carrier achieved statistically significant increases in delivery efficiency and transgene expression versus both K2 (negative control essentially) and the benchmark standard for efficiency, Superfect. While Superfect did achieve statistically significant improvements over K2, KNR2 had greater than an order of magnitude improvement in delivery efficiency versus Superfect in this model system

Table 1: Mean and standard error for beta-galactosidase positive cells as percent of total number by treatment group.

Group	Mean	Std. Error.
AK1	15.00	0.75
AL1	0.03	0.01
AM1	1.24	0.05

P=0.0001 (Significant at 99%)

[0139] Results for toxicity are presented in Figure 4, which depicts the percent of total area that remained nonviable 24 hours post treatment. Here, K2 exhibits statistically significant cellular toxicity relative to KNR2 or Superfect, even at a dose where K2 has low efficiency of transfer as described previously (Amabile, P.G., J.M. Waugh, T. Lewis, C.J. Elkins, T. Janus, M.D. Kuo, and M.D. Dake. Intravascular Ultrasound Enhances in vivo Vascular Gene Delivery. J.Am.Col.Cardiol. 2001 June; 37(7): 1975-80).

Conclusions:

[0140] The peptidyl transdermal carrier can transport large complexes across skin with high efficiencies, particularly given the constraints of transgene expression and total complex size discussed previously. Positive area here, rather than positive number was employed for analyses since (1) the method is greatly simplified and has greater accuracy in image analysis, (2) point demonstrations of efficiencies had already been afforded in II.B conclusively, (3) area measurements provide a broader scope for understanding in vivo results since noncellular components occupy a substantial portion of the cross section, and (4) comparison to still larger nonpeptidyl carrier complexes was facilitated

Example 3

[0141] This example illustrates the transdermal delivery of a large nucleotide-based therapeutic across skin using a positively charged peptidyl carrier of the invention in seven sequential daily applications.

Backbone selection:

[0142] The positively charged peptidyl backbone was assembled by covalently attaching $-\text{Gly}_3\text{Arg}_7$ to polylysine (MW 150,000) via the carboxyl of the terminal glycine to free amines of the lysine sidechains at a degree of saturation of 18% (i.e., 18 out of each 100 lysine residues is covalently attached to a $-\text{Gly}_3\text{Arg}_7$). The modified backbone was designated "KNR2". The control polycation was unmodified polylysine (designated "K2", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) of the same size and from the same lot.

Therapeutic agent selection:

[0143] For the present experiment, an 8.5 kilobase plasmid (pSport-based template, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) containing the entire transgene for E. Coli beta-galactosidase (βgal) and partial flanking sequences driven by a cytomegalovirus (CMV) promoter was employed. This particular plasmid has a molecular weight of approximately 2,805,000 and was thus selected to evaluate delivery of very large therapeutics across skin via the peptidyl carriers.

Preparation of samples:

[0144] In each case, an excess of polycation was employed to assemble a final complex that has an excess of positive charge. Experimental ratios were selected to parallel the single dose experiments presented in the previous experiment. Nucleotide-therapeutic

dose was standardized across all groups as was total volume and final pH of the composition to be applied topically. Samples were prepared as follows:

Group labeled AK1: 8 micrograms of β gal plasmid (p/CMV-sport- β gal) per final aliquot (i.e. 240 micrograms total) and peptidyl carrier KNR2 at a charge ratio of 4:1 were mixed to homogeneity and diluted to 600 microliters with phosphate buffered saline. The resulting composition was mixed to homogeneity with 5.4 ml of Cetaphil and aliquoted in 200 microliter portions for in vivo experiments.

Group labeled AL1: 8 micrograms of β gal plasmid (p/CMV-sport- β gal) per final aliquot (i.e. 240 micrograms total) and K2 at a charge ratio of 4:1 were mixed to homogeneity and diluted to 600 microliters with phosphate buffered saline. The resulting composition was mixed to homogeneity with 5.4 ml of Cetaphil and aliquoted in 200 microliter portions for in vivo experiments.

Animal experiments to determine cumulative transdermal delivery efficiencies after 7 once-daily treatments with peptidyl carriers and nucleotide therapeutics:

[0145] Animals were anesthetized via inhalation of isoflurane during application of treatments. After being anesthetized, C57 black 6 mice (n=4 per group) had metered 200 microliter doses of the appropriate treatment applied to the cranial portion of dorsal back skin (selected because the mouse cannot reach this region with mouth or limbs). Animals did not undergo depilatory treatment. Animals were recovered in a controlled heat environment to prevent hypothermia and once responsive were provided food and water ad libitum overnight. This procedure was repeated once daily at the same approximate time of day for 7 days. After 7 days treatment, mice were euthanized via inhalation of CO₂, and treated skin segments were harvested at full thickness by blinded observers. Treated segments were divided into three equal portions the cranial portion was fixed in 10% neutral buffered formalin for 12-16 hours then stored in 70% ethanol until paraffin embedding. The central portion was snap-frozen and employed directly for beta-galactosidase staining at 37 degrees Celsius on sections as previously described. The treated caudal segment was snap frozen for solubilization studies.

Data handling and statistical analyses:

[0146] Data collection and image analysis were performed by blinded observers. Sections stained as above were photographed in their entirety on a Nikon E600 microscope

with plan-apochromat lenses. Resulting images underwent batch image analysis processing using Image Pro Plus software as before with manual confirmation to determine area positive for beta-galactosidase enzyme activity. These results were normalized to total cross-sectional area for each and tabulated as percent cross-sectional positive staining. Subsequently, mean and standard error were subsequently determined for each group with analysis of significance at 95% confidence in one way ANOVA repeated measures using Statview software (Abacus, Berkeley, CA).

Results:

[0147] Results are summarized in the table below and illustrated in Figure 5. The peptidyl transdermal delivery carrier achieved statistically significant increases in delivery efficiency and transgene expression versus K2.

Table 2: Mean and standard error for cumulative transgene expression of beta-galactosidase as percent of total area after 7 once-daily applications for each treatment group.

Group	Mean	Std. Error.
AK	5.004	2.120
AL	0.250	0.060

P=0.0012 (Significant at 99%)

Example 4 (non-peptidyl carrier).

[0148] This example illustrates the transdermal delivery of a large nucleotide-based therapeutic across skin, using a positively charged non-peptidyl carrier of the invention in seven sequential daily applications.

Backbone selection:

[0149] The positively charged backbone was assembled by covalently attaching –Gly₃Arg₇ to polyethyleneimine (PEI, MW 1,000,000) via the carboxyl of the terminal glycine to free amines of the PEI sidechains at a degree of saturation of 30% (i.e., 30 out of each 100 lysine residues is covalently attached to a –Gly₃Arg₇). The modified backbone was designated “PEIR” to denote the large nonpeptidyl carrier. The control polycation was unmodified PEI (designated “PEI”, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) of the same size and from the same lot.

Therapeutic agent selection:

[0150] For the present experiment, an 8.5 kilobase plasmid (pSport-based template, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) containing the entire transgene for E. Coli beta-galactosidase (β gal) and partial flanking sequences driven by a cytomegalovirus (CMV) promoter was employed. This particular plasmid has a molecular weight of approximately 2,805,000.

Preparation of samples:

[0151] In each case, an excess of polycation was employed to assemble a final complex that has an excess of positive charge. Nucleotide-therapeutic dose was standardized across all groups as was total volume and final pH of the composition to be applied topically. Samples were prepared as follows:

Group labeled AS: 8 micrograms of β gal plasmid (p/CMV-sport- β gal) per final aliquot (i.e. 240 micrograms total) and control PEI at a charge ratio of 5:1 were mixed to homogeneity and diluted to 600 microliters with Tris-EDTA buffer. The resulting composition was mixed to homogeneity with 5.4 ml of Cetaphil and aliquoted in 200 microliter portions for in vivo experiments.

Group labeled AT: 8 micrograms of β gal plasmid (p/CMV-sport- β gal) per final aliquot (i.e. 240 micrograms total) and composite nonpeptidyl carrier PEIR ("PEIR") at a charge ratio of 5:1 were mixed to homogeneity and diluted to 600 microliters with Tris-EDTA buffer. The resulting composition was mixed to homogeneity with 5.4 ml of Cetaphil and aliquoted in 200 microliter portions for in vivo experiments.

Group labeled AU: 8 micrograms of β gal plasmid (p/CMV-sport- β gal) per final aliquot (i.e. 240 micrograms total) and highly purified Essentia nonpeptidyl carrier PEIR ("pure PEIR") at a charge ratio of 5:1 were mixed to homogeneity and diluted to 600 microliters with Tris-EDTA buffer. The resulting composition was mixed to homogeneity with 5.4 ml of Cetaphil and aliquoted in 200 microliter portions for in vivo experiments.

Animal experiments to determine cumulative transdermal delivery efficiencies after 7 once-daily treatments with nonpeptidyl carriers and nucleotide therapeutics:

[0152] Animals were anesthetized via inhalation of isoflurane during application of treatments. After being anesthetized, C57 black 6 mice (n=3 per group) had metered 200

microliter doses of the appropriate treatment applied to the cranial prtion of dorsal back skin (selected because the mouse cannot reach this region with mouth or limbs). Animals did not undergo depilatory treatment. Animals were recovered in a controlled heat environment to prevent hypothermia and once responsive were provided food and water ad libitum overnight. This procedure was repeated once daily at the same approximate time of day for 7 days. After 7 days treatment, mice were euthanized via inhalation of CO₂, and treated skin segments were harvested at full thickness by blinded observers. Treated segments were divided into three equal portions the cranial portion was fixed in 10% neutral buffered formalin for 12-16 hours then stored in 70% ethanol until paraffin embedding. The central portion was snap-frozen and employed directly for beta-galactosidase staining at 37 degrees Celsius on sections as previously described. The treated caudal segment was snap frozen for solubilization studies.

Data handling and statistical analyses:

[0153] Data collection and image analysis were performed by blinded observers. Sections stained as above were photographed in their entirety on a Nikon E600 microscope with plan-apochromat lenses. Resulting images underwent batch image analysis processing using Image Pro Plus software with manual confirmation to determine area positive for beta-galactosidase enzyme activity. These results were normalized to total cross-sectional area for each and tabulated as percent cross-sectional positive staining. Subsequently, mean and standard error were subsequently determined for each group with analysis of significance at 95% confidence in one way ANOVA repeated measures using Statview software (Abacus, Berkeley, CA).

Results:

[0154] Results are summarized in the table below and illustrated in Figure 6. The nonpeptidyl transdermal delivery carrier – in both a composite form and in an ultrapure form - achieved statistically significant increases in delivery efficiency and transgene expression versus PEL. The ultrapure form of PEIR exhibited|trending toward higher efficiencies than standard PEIR consistent with the higher calculated specific activity of the reagent.

Table 3: Mean and standard error for cumulative transgene expression of beta-galactosidase as percent of total area after 7 once daily applications for each treatment group.

Group	Mean	Std. Error.
-------	------	-------------

AS	0.250	0.164
AT	2.875	0.718
AU	3.500	0.598

$P=0.0058$ (Significant at 99%)

Conclusions:

[0155] The nonpeptidyl transdermal carrier can transport large complexes across skin with high efficiencies, particularly given the constraints of transgene expression and total complex size discussed previously. While the efficiencies are not as great as those obtained with the smaller complexes of the peptidyl carriers), significant gains were accomplished. Of note, the distribution of transgene expression using the large nonpeptidyl complexes was almost exclusively hair follicle-based, while the results for the peptidyl carriers were diffuse throughout the cross-sections. Thus, size and backbone tropism can be employed for a nano-mechanical targeting of delivery.

Example 5

[0156] This experiment demonstrates the use of a peptidyl carrier to transport a large complex containing an intact labeled protein botulinum toxin across intact skin after a single time administration relative to controls. Botulinum toxin was chosen here as a model system for large proteins, such as agents for immunoleation, for example.

Backbone selection:

[0157] The positively charged backbone was assembled by covalently attaching -Gly₃Arg₇ to polylysine (MW 112,000) via the carboxyl of the terminal glycine to free amines of the lysine side chains at a degree of saturation of 18% (i.e., 18 out of each 100 lysine residues is covalently attached to a -Gly₃Arg₇). The modified backbone was designated "KNR". The control polycation was unmodified polylysine (designated "K", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) of the same size and from the same lot.

Therapeutic agent:

[0158] Botox® brand of botulinum toxin A (Allergan) was selected for this experiment. It has a molecular weight of approximately 150,000.

Preparation of samples:

[0159] The botulinum toxin was reconstituted according to the manufacturer's instructions. An aliquot of the protein was biotinylated with a calculated 12-fold molar excess of sulfo-NHS-LC biotin (Pierce Chemical). The labeled product was designated "Btox-b".

[0160] In each case, an excess of polycation was employed to assemble a final complex that has an excess of positive charge as in delivery of highly negative large nucleotide complexes. A net neutral or positive charge prevents repulsion of the protein complex from highly negative cell surface proteoglycans and extracellular matrix. Btox-b dose was standardized across all groups, as was total volume and final pH of the composition to be applied topically. Samples were prepared as follows:

Group labeled "JMW-7": 2.0 units of Btox-b per aliquot (i.e. 20 U total) and peptidyl carrier KNR at a calculated MW ratio of 4:1 were mixed to homogeneity and diluted to 200 microliters with phosphate buffered saline. The resulting composition was mixed to homogeneity with 1.8 ml of Cetaphil and aliquoted in 200 microliter portions.

Group labeled "JMW-8": 2.0 units of Btox-b per aliquot (i.e. 20 U total) and K at a charge ratio of 4:1 were mixed to homogeneity and diluted to 200 microliters with phosphate buffered saline. The resulting composition was mixed to homogeneity with 1.8 ml of Cetaphil and aliquoted in 200 microliter portions.

Animal experiments to determine transdermal delivery efficiencies after single time treatment with peptidyl carriers and labeled Botulinum toxin :

[0161] Animals were anesthetized via inhalation of isoflurane during application of treatments. After being anesthetized, C57 black 6 mice (n=4 per group) underwent topical application of metered 200 microliter dose of the appropriate treatment applied to the cranial portion of dorsal back skin (selected because the mouse cannot reach this region with mouth or limbs). Animals did not undergo depilation. At 30 minutes after the initial treatment, mice were euthanized via inhalation of CO₂, and treated skin segments were harvested at full thickness by blinded observers. Treated segments were divided into three equal portions; the cranial portion was fixed in 10% neutral buffered formalin for 12-16 hours then stored in 70% ethanol until paraffin embedding. The central portion was snap-frozen and employed

directly for biotin visualization by blinded observers as summarized below. The treated caudal segment was snap frozen for solubilization studies.

[0162] Biotin visualization was conducted as follows. Briefly, each section was immersed for 1 hour in NeutrAvidin® buffer solution. To visualize alkaline phosphatase activity, cross sections were washed in saline four times then immersed in NBT/BCIP (Pierce Scientific) for 1 hour. Sections were then rinsed in saline and photographed in entirety on a Nikon E600 microscope with plan-apochromat lenses.

Data handling and statistical analysis:

[0163] Total positive staining was determined by blinded observer via batch image analysis using Image Pro Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) and was normalized to total cross-sectional area to determine percent positive staining for each. Mean and standard error were subsequently determined for each group with analysis of significance at 95% confidence in one way ANOVA repeated measures using Statview software (Abacus, Berkeley, CA).

Results:

[0164] The mean cross-sectional area positive for biotinylated botulinum toxin was reported as percent of total area after single-time topical administration of Btox-b with either KNR ("EB-Btox") or K ("nl"). The results are presented in the following table and are illustrated in Figure 7. In Figure 7, the area positive for label was determined as percent of total area after three days of once daily treatment with "EB-Btox" which contained Btox-b and the peptidyl carrier KNR and "nl", which contained Btoxb with polycation K as a control. Mean and standard error are depicted for each group.

Table 4: Mean and standard error for labeled botulinum toxin area as percent of total cross-section after single time topical administration of Btox-b with KNR (JMW-7) or K (JMW-8) for 30 minutes.

Group	Mean	Std. Error
JMW-7	33.000	5.334
JMW-8	8.667	0.334

P=0.0001 (Significant at 99%)

Example 6

[0165] Example 5 demonstrated that the peptidyl transdermal carrier allowed efficient transfer of botulinum toxin after topical administration in a murine model of intact skin. However, this experiment did not indicate whether the complex protein botulinum toxin was released in a functional form after translocation across skin. The following experiment was thus constructed to evaluate whether botulinum toxin can be therapeutically delivered across intact skin as a topical agent using this peptidyl carrier (again, without covalent modification of the protein).

[0166] The positively charged backbone was again assembled by covalently attaching -Gly₃Arg₇ to polylysine MW 112,000 via the carboxyl of the terminal glycine to free amines of the lysine side chains at a degree of saturation of 18% (i.e., 18 out of each 100 lysine residues is covalently attached to a -Gly₃Arg₇). The modified backbone was designated "KNR". Control polycation was unmodified polylysine (designated "K", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) of the same size and from the same lot. The same botulinum toxin therapeutic agent was used as in Example 5, and was prepared in the same manner. Samples were prepared as follows:

Group labeled "JMW-9": 2.0 units of botulinum toxin per aliquot (i.e. 60 U total) and peptidyl carrier KNR at a calculated MW ratio of 4:1 were mixed to homogeneity and diluted to 600 microliters with phosphate buffered saline. The resulting composition was mixed to homogeneity with 5.4 ml of Cetaphil and aliquoted in 200 microliter portions.

Group labeled "JMW-10": 2.0 units of botulinum toxin per aliquot (i.e. 60 U total) and K at a charge ratio of 4:1 were mixed to homogeneity and diluted to 600 microliters with phosphate buffered saline. The resulting composition was mixed to homogeneity with 5.4 ml of Cetaphil and aliquoted in 200 microliter portions.

Group labeled "JMW-11": 2.0 units of botulinum toxin per aliquot (i.e. 60 U total) without polycation was diluted to 600 microliters with phosphate buffered saline. The resulting composition was mixed to homogeneity with 5.4 ml of Cetaphil and aliquoted in 200 microliter portions.

Animal experiments to determine therapeutic efficacy after single time treatment with peptidyl carriers and botulinum toxin:

[0167] Animals were anesthetized via inhalation of isoflurane during application of treatments. After being anesthetized, C57 black 6 mice (n=4 per group) underwent topical application of metered 400 microliter dose of the appropriate treatment applied uniformly from the toes to the mid-thigh. Both limbs were treated, and treatments were randomized to either side. Animals did not undergo depilation. At 30 minutes after the initial treatment, mice were evaluated for digital abduction capability according to published digital abduction scores for foot mobility after botulinum toxin administration (Aoki, KR. A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice. Toxicon. 2001 Dec; 39(12): 1815-20). Mouse mobility was also subjectively assessed.

Data handling and statistical analysis:

[0168] Digital abduction scores were tabulated independently by two blinded observers. Mean and standard error were subsequently determined for each group with analysis of significance at 95% confidence in one way ANOVA repeated measures using Statview software (Abacus, Berkeley, CA).

Results:

[0169] Mean digital abduction scores after single-time topical administration of botulinum toxin with KNR ("JMW-9"), K ("JMW-10") or diluent without polycation ("JMW-11"), are presented in the table below and illustrated in the representative photomicrograph of Figure 8. The peptidyl carrier KNR afforded statistically significant functional delivery of the botulinum toxin across skin relative to both controls, which were comparable to one another. Additional independent repetitions (total of three independent experiments all with identical conclusions in statistically significant paralysis from topical botulinum toxin with KNR but not controls) of the present experiment confirmed the present findings and revealed no significant differences between topical botulinum toxin with or without K (i.e. both controls). Interestingly, the mice consistently ambulated toward a paralyzed limb (which occurred in 100% of treated animals and 0% of controls from either control group). As shown in Figure 8, a limb treated with botulinum toxin plus the control polycation polylysine or with botulinum toxin without polycation ("Btox alone") can mobilize digits (as a defense mechanism when picked up), but the limbs treated with botulinum toxin plus the peptidyl carrier KNR ("Essentia Btox lotion") could not be moved.

Table 5: Digital abduction scores 30 minutes after single-time topical application of botulinum toxin with the peptidyl carrier KNR ("JMW-9"), with a control polycation K ("JMW-10"), or alone ("JMW-11").

Group	Mean	Std. Error
JMW-9	3.333	0.333
JMW-10	0.333	0.333
JMW-11	0.793	0.300

P=0.0351 (Significant at 95%)

Conclusions:

[0170] This experiment serves to demonstrate that the peptidyl transdermal carrier can transport a therapeutically effective amount of botulinum therapeutic across skin without covalent modification of the therapeutic. The experiment also confirms that botulinum toxin does not function when applied topically in controls.

Example 7

[0171] This experiment demonstrates the performance of a non-peptidyl carrier in the invention.

Backbone selection:

[0172] The positively charged backbone was assembled by covalently attaching -Gly₃Arg₇ to polyethyleneimine (PEI) MW 1,000,000 via the carboxyl of the terminal glycine to free amines of the PEI side chains at a degree of saturation of 30% (i.e., 30 out of each 100 lysine residues is covalently attached to a -Gly₃Arg₇). The modified backbone was designated "PEIR" to denote the large nonpeptidyl carrier. Control polycation was unmodified PEI (designated "PEI", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) of the same size and from the same lot. The same botulinum toxin therapeutic agent was used as in example 5.

[0173] Botulinum toxin was reconstituted from the BOTOX® product according to the manufacturer's instructions. In each case, an excess of polycation was employed to assemble a final complex that had an excess of positive charge as in delivery of highly negative large nucleotide complexes. A net neutral or positive charge prevents repulsion of the protein complex from highly negative cell surface proteoglycans and extracellular matrix. The botulinum toxin dose was standardized across all groups as was total volume and final pH of the composition to be applied topically. Samples were prepared as follows:

Group labeled "AZ": 2.0 units of botulinum toxin per aliquot (i.e. 60 U total) and the nonpeptidyl carrier PEIR in ultrapure form at a calculated MW ratio of 5:1 were mixed to homogeneity and diluted to 600 microliters with phosphate buffered saline. The resulting composition was mixed to homogeneity with 5.4 ml of Cetaphil and aliquoted in 200 microliter portions.

Group labeled "BA": 2.0 units of botulinum toxin per aliquot (i.e. 60 U total) and PEI at a charge ratio of 5:1 were mixed to homogeneity and diluted to 600 microliters with phosphate buffered saline. The resulting composition was mixed to homogeneity with 5.4 ml of Cetaphil and aliquoted in 200 microliter portions.

Animal experiments to determine therapeutic efficacy after single time treatment:

[0174] Animals were anesthetized via inhalation of isoflurane during application of treatments. After being anesthetized, C57 black 6 mice (n=3 per group) underwent topical application of metered 400 microliter dose of the appropriate treatment applied uniformly from the toes to the mid-thigh. Both limbs were treated, and treatments were randomized to either side. Animals did not undergo depilation. At 30 minutes after the initial treatment, mice were evaluated for digital abduction capability according to published digital abduction scores for foot mobility after botulinum toxin administration (Aoki, KR. A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice. Toxicon. 2001 Dec; 39(12): 1815-20). Mouse mobility was also subjectively assessed.

Data handling and statistical analysis:

[0175] Digital abduction scores were tabulated independently by two blinded observers. Mean and standard error were subsequently determined for each group with analysis of significance at 95% confidence in one way ANOVA repeated measures using Statview software (Abacus, Berkeley, CA).

Results:

[0176] Mean digital abduction scores after single-time topical administration of botulinum toxin with ultrapure PEIR ("AZ"), or control polycation PEI ("BA"), and repetition (single independent repetition for this experiment), are presented in the tables below. The nonpeptidyl carrier PEIR afforded statistically significant functional delivery of botulinum toxin across skin relative to controls. As before, animals were observed to walk in circles toward the paralyzed limbs.

Table 6: Repetition 1. Digital abduction scores 30 minutes after single-time topical administration of Botulinum toxin with ultrapure PEIR ("AZ"), or control polycation PEI ("BA"). Mean and standard error are presented.

Group	Mean	Std. Error
BA	0.833	0.307
AZ	3.917	0.083

P=0.0002 (Significant at 99%)

Table 7: Repetition 2. Digital abduction scores 30 minutes after single-time topical administration of Botulinum toxin with ultrapure PEIR ("AZ1"), or control polycation PEI ("BA1"). Mean and standard error are presented.

Group	Mean	Std. Error
BA1	0.333	0.211
AZ1	3.833	0.167

P=0.0001 (Significant at 99%)

Conclusions:

[0177] This experiment demonstrated that the nonpeptidyl transdermal carrier can transport therapeutic doses of botulinum toxin across skin without prior covalent modification of the botulinum toxin. These findings complement those with peptidyl transfer agents. The option of using a nonpeptidyl or a peptidyl carrier to achieve the therapeutic effect will allow tailoring to specific circumstances, environments, and methods of application and add to the breadth of the transdermal delivery platform of this invention.

[0178] In these examples botulinum toxin penetration with either peptidyl or nonpeptidyl carriers versus topical botulinum toxin without the carrier further establishes utility for transdermal penetration of antigens for immunization, particularly for immunization with antigens that cross skin poorly otherwise such as botulinum. Delivery of a functional botulinum toxin ensures that at least four distinct epitopes have been delivered transdermally in an intact state; the fact that functional botulinum toxin was not delivered in the absence of the carrier in either example confirms that the carrier affords significant immunization potential relative to the agent in the absence of the carrier. Since immunization requires that the antigens cross skin in a sufficient quantity to mount an immune response, this approach allows transdermal delivery of an antigen for immunization. Since this approach does not require covalent modification of the antigen and need not involve viral gene transfer, a number of advantages arise in terms of safety stability, and efficiency.

Example 8

[0179] This experiment details production of peptidyl and nonpeptidyl carriers with TAT efficiency factors, as well as assembly of these carriers with botulinum toxins.

Coupling of polyethylene imine (PEI) to TAT fragment GGGRKKRRQRRR:

[0180] The TAT fragment GGGRKKRRQRRR (6mg, 0.004 mmol, Sigma Genosys, Houston, TX), lacking all sidechain protecting groups, was dissolved in 1 ml of 0.1M MES buffer. To this was added EDC (3 mg, 0.016 mmol) followed by PEI 400k molecular weight 50% solution (w:v) in water, (~0.02 ml, $\sim 2.5 \times 10^{-5}$ mmol) The pH was determined to be 7.5 by test paper. Another 1 ml portion of 0.1M MES was added and the pH was adjusted to ~5 by addition of HCl. Another portion of EDC (5 mg, 0.026 mmol) was added and the reaction, pH~5 was stirred overnight. The next morning, the reaction mixture was frozen and lyophilized.

[0181] A column (1cm diameter x 14 cm height) of Sephadex G-25 (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) was slurried in sterile 1x PBS. The column was standardized by elution of FITC dextrans (Sigma, St Louis, MO) having 19kD molecular weight. The standard initially eluted at 5 ml PBS, had mid peak at 6 ml and tailed at 7 ml. The lyophilized reaction mixture from above was dissolved in a small volume PBS and applied to the column. It was eluted by successive applications of 1 ml PBS. Fractions were collected with the first one consisting of the first 3 ml eluted, including the reaction volume. Subsequent fractions were 1 ml.

[0182] The fractions eluted were assayed for UV absorbance at 280 nm. Fractions 3, 4 and 5 corresponding to 5-7 ml defined a modest absorbance peak. All fractions were lyophilized and IR spectra were taken. The characteristic guanidine triple peak ($2800-3000 \text{ cm}^{-1}$) of the TAT fragment was seen in fractions 4-6. These fractions also showed an amide stretch at 1700 cm^{-1} thus confirming the conjugate of the TAT fragment and PEI.

[0183] Another iteration was run using the TAT fragment GGGRKKRRQRRR (11.6 mg, 0.007 mmol). This amount was calculated such that one in 30 of the PEI amines would be expected to be reacted with TAT fragment. This approximates the composition of the original polylysine-oligoarginine (KNR) efficiency factor described above. Successful covalent attachment of the TAT fragment to the PEI amines was confirmed by IR as above.

Coupling of Polylysine to TAT fragment:

[0184] To a solution of polylysine (10 mg 1.1×10^{-4} mmol; Sigma) in 1 ml of 0.1M MES, pH ~ 4.5 was added TAT fragment (4 mg, 0.003 mmol) then EDC (3.5 mg, 0.0183 mmol). The resulting reaction mixture (pH ~ 4.5) was stirred at room temperature. The reaction was frozen at -78 °C overnight. The next day the reaction mixture was thawed to

65

room temperature and the pH was adjusted to ~8 by the addition of saturated sodium bicarbonate. The reaction mixture was applied directly to a Sephadex G-25 column constituted and standardized as described above. It was eluted in seven 1 ml fractions, starting after 5 ml. UV 280 absorbance was taken, revealing a relative peak in fraction 2, 3 and 4. IR of the lyophilized fractions revealed the characteristic guanidine peak (2800-3000 cm^{-1}) in fractions 1-7. Fraction 1 had a strong peak at 1730 cm^{-1} and nothing at 1600 cm^{-1} , but for fractions 2-6 the opposite was true. Thus, successful covalent attachment of the TAT fragment to a peptidyl carrier, polylysine, was confirmed.

[0185] The covalently attached TAT fragment and PEI (PEIT) and the covalently attached TAT fragment and polylysine (KNT) were subsequently mixed with botulinum toxin to form a noncovalent complex as below:

Group labeled "JL-1": 2.0 units of Btox-b per aliquot (i.e. 20 U total) and PEIT at a charge ratio of 4:1 were mixed to homogeneity and diluted to 200 microliters with phosphate buffered saline.

Group labeled "JL-2": 2.0 units of Btox-b per aliquot (i.e. 20 U total) and KNT at a charge ratio of 4:1 were mixed to homogeneity and diluted to 200 microliters with phosphate buffered saline.

[0186] After noncovalent complex formation, particles were centrifuged at 12,000 x g in a rotary microcentrifuge for 5 minutes, then resuspended in 20 microliters of deionized water and evaporated on a Germanium attenuated total reflectance cell for IR. Presence of Btox-b in the complexes was thus confirmed. Overall, this experiment confirmed that synthetic schemes could be applied to other efficiency factors and the resulting carriers can be complexed with a biologically active agent – in this case botulinum toxin – as in prior examples using carriers with oligoarginine positively charged branching or efficiency groups.

Example 9

[0187] This experiment demonstrates the performance of a peptidyl carrier for imaging of a specific antigen. In this example, complexes of one of the Essentia peptidyl carriers, KNR2, with optical imaging moieties and modified antibodies targeting melanoma are suitable for topical detection of melanoma.

Backbone selection:

[0188] The positively charged peptidyl backbone was assembled by covalently attaching $\text{--Gly}_3\text{Arg}_7$ to polylysine (MW 150,000) via the carboxyl of the terminal glycine to free amines of the lysine sidechains at a degree of saturation of 18% (i.e., 18 out of each 100 lysine residues is covalently attached to a $\text{--Gly}_3\text{Arg}_7$). The modified backbone was designated "KNR2". The control polycation was unmodified polylysine (designated "K2", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) of the same size and from the same lot.

[0189] A murine monoclonal antibody to a conserved human melanoma domain, ganglioside 2, (IgG3, US Biologicals, Swampscott, MA) was covalently attached to a short polyaspartate anion chain (MW 3,000) via EDC coupling as above to generate a derivatized antibody designated "Gang2Asp". Additionally, an anionic imaging agent was designed using an oligonucleotide as a polyanion wherein the sequence was ATGC-J (designated "ATGC-J" henceforth) with "J" representing a covalently attached Texas Red fluorophore, (Sigma Genosys, Woodlands, TX). For this experiment, 6.35 micrograms of Gang2Asp was combined with 0.1712 micrograms of ATGC-J and then complexed with 17.5 micrograms of KNR2 in a total volume of 200 microliters of deionized water to attain a final ratio of 5:1:1::KNR2:ATGC-J:Gang2Asp. The mixture was vortexed for 2 minutes. The resulting complexes were applied to hydrated CellTek Human Melanoma slides and control CellTek Cytokeratin Slides (SDL, Des Plaines, IL) and incubated for 5 minutes before photographic evaluation of fluorescence distribution versus brightfield distribution of melanoma pigment in the same field. Additional controls without ATGC-J or without Gang2Asp were also employed.

Results:

[0190] The non-covalent complexes afforded a distribution of the optical imaging agent that followed the tropism of the antibody derivative rather than the distribution of the complexes in the absence of the antibody. More noteworthy, the complexes followed a distribution that matched that of the pigmented melanoma cells, as depicted in Figure 9.

Conclusions:

[0191] This experiment demonstrates the production of a viable complex for transport across skin and visualization of melanoma through optical techniques using a carrier suitable for topical delivery. Such an approach could be employed for example in conjunction with surgical margin-setting or could be employed in routine melanoma surveillance. Similar

strategies could readily be employed for topical diagnosis of other skin-related disorders as well, as will be apparent to one skilled in the art. Given the very high sensitivity of optical imaging moieties, significant promise in improved detection of these disorders could be afforded through these non-covalent complexes.

Example 10

[0192] This experiment demonstrates the efficiency and depth of penetration of a peptidyl carrier in transdermal delivery of a mixture of proteins of different size and structure.

Methods:

[0193] Revitix proteins [Organogenesis, Canton, MA] were biotinylated and stored at 4° Celsius. The concentration of biotinylated Revitix proteins used was 10-15 ng/μl. The test article and comparative controls in this study are shown in the Table 1. This study had two controls, one with deionized water pH matched to the Revitix and the other with Revitix by itself. The test article for the treatment group was the Revitix with peptidyl carrier.

Table 8: Description of test article and comparative controls.

Groups	Test article and comparative controls	Study time-points
A	Water, pH 7.0	2 days
B	Revitix only	2 days
C	Revitix + carrier	2 days
D	Water, pH 7.0	9 days
E	Revitix only	9 days
F	Revitix + carrier	9 days

Animal experiments to determine cumulative transdermal delivery efficiency after 2 and 9 once-daily treatments with peptidyl carriers and Revitix proteins:

[0194] C57 black 6 female mice (n=5 per group) were anesthetized via inhalation of isoflurane and then injected with 0.05 ml rodent anesthetic cocktail (3.75 ml of 100 mg/ml Ketamine, 3.00 ml of 20 mg/ml Xylazine, and 23.25 ml of saline) intraperitoneally. After each mouse was anesthetized a 2.0 cm x 2.0 cm dose site on the dorsum of each mouse was carefully shaved with a hair clipper (Oster) two days before the first day of treatment application. Animals did not undergo further depilatory treatment. Animals were anesthetized via inhalation of isoflurane only during the application of treatments in

Cetaphil moisturizing cream (Galderma, Fort Worth, TX) and had metered 200 microliter doses of the appropriate treatment applied to the cranial portion of dorsal back skin (selected because the mouse cannot reach this region with mouth or limbs). Animals remained under anesthesia for 2-5 minutes while the appropriate treatment was rubbed into the skin with finger covers. Animals were recovered in a controlled heat environment to prevent hypothermia and once responsive were provided food and water ad libitum overnight. This procedure was repeated once daily at the same approximate time of day for 2 and 9 days. After 2 and 9 days treatment, mice were euthanized via inhalation of CO₂, and treated skin segments were harvested at full thickness by blinded observers at 8 hours post application of the last treatment. Treated segments were divided into three equal portions the cranial portion was fixed in 10% neutral buffered formalin for 12-16 hours then stored in 70% ethanol until paraffin embedding. The central portion was employed for NeutrAvidin, Hematoxylin & Eosin, and Chloroesterase-specific staining. The treated caudal segment was snap frozen for solubilization studies.

Data handling and statistical analysis:

[0195] Data collection and image analysis were performed by blinded observers. Stained sections were photographed with a Retiga 1300B camera (QImaging, Burnaby, BC, Canada) on a Nikon B600 microscope with plan-apochromat lenses. Positive staining was determined by a blinded observer using Image-Pro Plus analysis software (Media Cybernetics, Silver Springs, MD) with green channel extraction and thresholding, and expressed as positive pixels. Statistical analysis was subsequently determined for each group using Statview® software (Abacus Concepts, Berkeley, CA) and expressed as mean and standard error. Statistical significance for all comparison was determined using one-factor ANOVA repeated measures and Fisher PLSD post-hoc testing at 95% confidence

Results:

[0196] The Revitix proteins were labeled with biotin and good labeling on variety of proteins was shown. NeutrAvidin staining was used to determine transdermal delivery of Revitix protein. The photographs of control group (panel a and c and e) vs. treatment group (b and d and f) at two different magnifications are shown in Figure 10, where a and b are at 10X magnification and c through f are at 20X magnification. The mean for positive NeutrAvidin staining was used for comparison. The mean positive staining for Revitix plus

backbone was significantly higher than water at 3 day (50.297 ± 6.394 vs. 16.676 ± 2.749) and Revitix alone (50.297 ± 6.394 vs. 18.379 ± 6.394 ; $P = 0.0041$).

Table 9: Positive NeutraAvidin staining. Mean and standard error are presented.

Group	Mean	Std. Error
A	16.676	2.749
B	18.379	6.394
C	50.297	6.394

$P=0.0041$ (Significant at 95%)

Conclusion:

[0197] Gel analysis of biotin-labeled proteins allowed confirmation of label in vitro.

[0198] The 2-day time-point was used to determine flux. This experiment confirmed a statistically significant increase in transdermal delivery of labeled proteins versus both control groups. Both depth and amount of signal increased markedly in the carrier group versus the controls. Interestingly, a diverse population of proteins was transported across skin with these pre-assembled particles as verified by gel electrophoresis and spatial assessments of tropisms.

Example 11

[0199] These experiments demonstrate a novel molecular imaging platform capable of targeted transepithelial delivery of fluorescent probes by use of peptidyl carrier and tumor antigen antibodies.

Backbone:

[0200] The positively charged peptidyl backbone was assembled by covalently attaching $-\text{Arg}_9$ to polylysine (MW 150,000) via the carboxyl of the terminal glycine to free amines of the lysine sidechains at a degree of saturation of 18% (i.e., 18 out of each 100 lysine residues is covalently attached to a $-\text{Arg}_9$). The modified backbone was designated "KNR". The control polycation was unmodified polylysine (designated "K", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) of the same size and from the same lot.

Methods:***Probe design:***

[0201] The probe is a multi-component system that self-assembles based on electrostatic interactions. Such a system allows for easy substitution of functional moieties. The central component is a carrier backbone that has an excess of positive charges and multiple CPPs attached. All cargos are negatively charged. The final complex has a net positive charge to maintain transport activity.

In vitro carrier toxicity:

[0202] The following carrier backbone were tested for toxicity:

1. KNR
2. Poly-L-lysine without R9 side chains (K)
3. Superfect (Qiagen, Valencia, CA), a commercial transfection agent

HeLa cells (ATCC, Manassas, VA) grown at 70% confluency were incubated with 0.4mg of carriers (n=6 wells/group) in serum free media for 2 hours and then washed with PBS. Toxicity was assessed using a standard dye exclusion assay where viable cells exclude dye while nonviable cells do not. Dye uptake was measured using a spectrophotometer (Spectronic Genesys 5 UV/VIS) at 595nm wavelength. Samples were standardized to cell number by adjusting concentrations to matching OD280 values prior to OD595 measurements.

In vivo transdermal reporter gene delivery:

[0203] To determine whether the KNR carrier can deliver large molecular weight cargo in the form of bioluminescence reporter genes across a tissue barrier (skin), the following probes were tested with varying carrier backbones:

1. Backbones: KNR; Controls—K, Superfect, no carrier
2. Cargo and imaging moiety: Plasmid expressing blue fluorescent protein (BFP, 8kb, 2.6 million MW)

Backbone-plasmid (8µg plasmid) complexes were formed via ionic interactions (cationic backbone—anionic DNA) and then applied to the dorsal skin of C57 black 6 mice (n=4 per group) daily for 7 days. Treated skin segments were then harvested and BFP expression was assessed by fluorescence microscopy. Transdermal gene delivery efficiency was determined by % BFP positive cells / total cells in the dermis only.

Targeted delivery of imaging probe to tumor cells:

[0204] To determine whether the KNR system can afford targeted delivery of optical imaging probes to colon cancer antigens, the following probes were tested with varying targeting components:

1. **Backbone:** KNR
2. **Imaging moiety:** 4-base oligonucleotide (Sigma-Genosys) labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC, Molecular Probes)
3. **Targeting moieties:** a) Monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen (CEA; clone CD66e, US Biological) covalently conjugated to anionic polyaspartate (3K MW) via EDC coupling; b) Control—Monoclonal antibody to actin (clone 3G1, US Biological) conjugated to polyaspartate

Following formation of KNR-imaging-targeting complexes, co-cultured (n=6 wells/group) human colon carcinoma cells (LS174T, ATCC) that overexpress CEA and control mouse fibroblasts (3T3, ATCC) were incubated with complexes in serum free media for 2 hours. Cells were subsequently washed 3X's with PBS. Targeted delivery was assessed by quantifying percent of LS174T cells and 3T3 cells labeled with FITC. 3T3 cells and LS174T cells were identified by morphology.

Results:

[0205] KNR achieved 20X greater efficiency in transdermal delivery and transgene expression of BFP versus control ($5\% \pm 2.12\%$ vs. $0.25\% \pm 0.06\%$, $P < 0.01$), validating the feasibility of topical delivery of complexes large enough for molecular imaging. In assessing targeted delivery, fluorescein and TR signals, even though each was a distinct component of the complex, co-localized in 40.2% of pixels of the colon carcinoma cells (phi correlation 0.74, $P < 0.001$). Control fibroblast cells were minimally labeled with fluorescein or TR while $87.6\% \pm 8.3\%$ of colon carcinoma cells were positive for fluorescein signal. Relative toxicity for carrier backbones results are shown in Figure 11 and transdermal gene delivery efficiency results are shown in Figure 12.

Brightfield image of colon carcinoma (C) and fibroblasts (F, spindle-shaped) co-culture following application of CEA-specific imaging probe (panel a) and fluorescence image showing fluorescein labeling of colon carcinoma but not fibroblasts (panel b) are depicted in Figure 13.

Table 10: Transdermal delivery and transgene expression of imaging probe. Mean and standard error in percentage are presented.

Group	Mean	Std. Error
BFP	5%	2.12%
Control	0.25%	0.06%

P<0.01 (Significant at 99%)

Conclusion:

[0206] Transdermal delivery of a large complex (BFP gene) after topical application and targeted delivery of an optical probe with parallels to antigen distribution were demonstrated using KNR. These studies confirm the feasibility of using this system for topical surveillance of melanoma or submucosal detection of colon cancer. As will be apparent to one skilled in the art, this platform can be used for targeted delivery of therapeutics, diagnostics, or combinations of both. Further, this platform can be used for real-time imaging via colonoscopy or dermatoscopy (or direct visualization) as well as imaging methods such as virtual colonoscopy.

[0207] It is understood that the examples and embodiments described herein are for illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be suggested to persons skilled in the art and are to be included within the spirit and purview of this application and scope of the appended claims. All publications, patents, and patent applications cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety for all purposes.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A composition comprising a biologically active protein and a carrier which comprises polymeric backbone having attached positively charged branching groups and which is present in an effective amount for transdermal delivery, wherein the association between the carrier and the biologically active protein is non-covalent.
2. A composition according to claim 1 in which the therapeutic protein excludes insulin, botulinum toxins, VEGF, and antibody fragments.
3. A composition according to claim 2 in which the therapeutic protein does not therapeutically alter blood glucose levels.
4. A composition according to claim 2 in which the therapeutic protein excludes botulinum toxins.
5. A composition according to claim 2 in which the therapeutic protein excludes VEGF.
6. A composition according to claim 2 in which the therapeutic protein excludes antibody fragments.
7. A composition according to claim 1 wherein the composition provides greater transdermal delivery of the biologically active protein relative to the agent in the absence of the carrier.
8. A composition according to claim 7 in which the biologically active protein has therapeutic activity.
9. A composition according to claim 8 in which the therapeutic protein has a molecular weight of less than 20,000 kD.
10. A composition according to claim 1 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide.
11. A composition according to claim 10 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide having a molecular weight of from about 10,000 to about 1,500,000.
12. A composition according to claim 10 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide having a molecular weight of from about 25,000 to about 1,200,000.

13. A composition according to claim 10 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide having a molecular weight of from about 100,000 to about 1,000,000.

14. A composition according to claim 10 in which the backbone comprises a positively charged polylysine.

15. A composition according to claim 14 in which the backbone comprises a positively charged polylysine having a molecular weight of from about 10,000 to about 1,500,000.

16. A composition according to claim 14 in which the backbone comprises a positively charged polylysine having a molecular weight of from about 25,000 to about 1,200,000.

17. A composition according to claim 14 in which the backbone comprises a positively charged polylysine having a molecular weight of from about 100,000 to about 1,000,000.

18. A composition according to claim 1 in which the backbone comprises a positively charged nonpeptidyl polymer.

19. A composition according to claim 18 in which the nonpeptidyl polymer backbone comprises a positively charged polyalkyleneimine.

20. A composition according to claim 19 in which the polyalkyleneimine is a polyethyleneimine.

21. A composition according to claim 20 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 10,000 to about 2,500,000.

22. A composition according to claim 20 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 100,000 to about 1,800,000.

23. A composition according to claim 20 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 500,000 to about 1,400,000.

24. A composition according to claim 1 in which the carrier comprises a polymeric backbone having attached positively charged branching groups selected from $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT and fragments thereof, and Antennapedia PTD and fragments thereof, in which the subscript $n1$ is an integer of from 0 to about 20, and the subscript $n2$ is independently an odd integer of from about 5 to about 25.

25. A composition according to claim 24 in which the positively charged branching groups are selected from groups having the formula $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$.

26. A composition according to claim 25 in which the subscript n1 is an integer of from about 1 to about 8.

27. A composition according to claim 25 in which the subscript n1 is an integer of from about 2 to about 5.

28. A composition according to claim 25 in which the subscript n2 is an odd number of from about 7 to about 17.

29. A composition according to claim 25 in which the subscript n2 is an odd number of from about 7 to about 13.

30. A composition according to claim 24 in which the branching groups are selected from HIV-TAT and fragments thereof.

31. A composition according to claim 30 in which the attached positively-charged branching groups are HIV-TAT fragments that have the formula $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$, or $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$ wherein the subscripts p and q are each independently an integer of from 0 to 20.

32. A composition according to claim 24 in which the branching groups are Antennapedia PTD groups or fragments thereof.

33. A composition comprising a non-protein non-nucleotide biologically active agent and a carrier which comprises a polymeric backbone having attached positively charged branching groups and which is present in an effective amount for transdermal delivery, wherein the association between the carrier and the biologically active agent is non-covalent.

34. A composition according to claim 33 wherein the composition provides greater transdermal delivery of the biologically active agent relative to the agent in the absence of the carrier.

35. A composition according to claim 34 in which the biologically active agent has a therapeutic activity.

36. A composition according to claim 33 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide.

37. A composition according to claim 36 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide having a molecular weight of from about 10,000 to about 1,500,000.

38. A composition according to claim 36 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide having a molecular weight of from about 25,000 to about 1,200,000.

39. A composition according to claim 36 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide having a molecular weight of from about 100,000 to about 1,000,000.

40. A composition according to claim 36 in which the backbone comprises a positively charged polylysine.

41. A composition according to claim 40 in which the backbone comprises a positively charged polylysine having a molecular weight of from about 10,000 to about 1,500,000.

42. A composition according to claim 40 in which the backbone comprises a positively charged polylysine having a molecular weight of from about 25,000 to about 1,200,000.

43. A composition according to claim 40 in which the backbone comprises a positively charged polylysine having a molecular weight of from about 100,000 to about 1,000,000.

44. A composition according to claim 33 in which the backbone comprises a positively charged nonpeptidyl polymer.

45. A composition according to claim 44 in which the nonpeptidyl polymer backbone comprises a positively charged polyalkyleneimine.

46. A composition according to claim 45 in which the polyalkyleneimine is a polyethyleneimine.

47. A composition according to claim 46 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 10,000 to about 2,500,000.

48. A composition according to claim 46 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 100,000 to about 1,800,000.

49. A composition according to claim 46 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 500,000 to about 1,400,000.

50. A composition according to claim 33 in which the carrier comprises a polymeric backbone having attached positively charged branching groups selected from $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT and fragments thereof, and Antennapedia PTD

and fragments thereof, in which the subscript n_1 is an integer of from 0 to about 20, and the subscript n_2 is independently an odd integer of from about 5 to about 25.

51. A composition according to claim 50 in which the positively charged branching groups are selected from groups having the formula $-(\text{gly})_{n_1}-(\text{arg})_{n_2}$.

52. A composition according to claim 51 in which the subscript n_1 is an integer of from about 1 to about 8.

53. A composition according to claim 51 in which the subscript n_1 is an integer of from about 2 to about 5.

54. A composition according to claim 51 in which the subscript n_2 is an odd number of from about 7 to about 17.

55. A composition according to claim 51 in which the subscript n_2 is an odd number of from about 7 to about 13.

56. A composition according to claim 50 in which the branching groups are selected from HIV-TAT and fragments thereof.

57. A composition according to claim 56 in which the attached positively-charged branching groups are HIV-TAT fragments that have the formula $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$, or $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$ wherein the subscripts p and q are each independently an integer of from 0 to 20.

58. A composition according to claim 50 in which the branching groups are Antennapedia PTD groups or fragments thereof.

59. A composition according to claim 33 containing from about 1×10^{-20} to about 25 weight % of the biologically active agent and from about 1×10^{-19} to about 30 weight % of the carrier.

60. A controlled release composition according to claim 33.

61. A kit for administration of a composition according to claim 1 to a subject comprising a device for delivering the biologically active agent and a carrier which comprises a polymeric backbone having attached positively charged branching groups and which is present in an effective amount for transdermal delivery.

62. A kit according to claim 60 wherein the biologically active agent excludes insulin, botulinum toxins, VEGF, and antibody fragments.

63. A kit according to claim 62 in which the composition is contained in a device for administering the biologically active protein to a subject via the skin or epithelium.

64. A kit according to claim 63 in which the device is a skin patch.

65. A kit for administration of a biologically active protein to a subject comprising a device for delivering the biologically active protein to the skin or epithelium and a composition comprising a polymeric carrier having attached positively charged branching groups selected from $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT and fragments thereof, and Antennapedia PTD and fragments thereof, in which the subscript $n1$ is an integer of from 0 to about 20, and the subscript $n2$ is independently an odd integer of from about 5 to about 25, wherein the association between the carrier and the biologically active protein is non-covalent.

66. A kit according to claim 65 in which the device is a skin patch.

67. A method of administering a biologically active protein to a subject comprising topically applying to the skin or epithelium of the subject the protein in conjunction with an effective amount of a carrier comprising a polymeric backbone having attached positively charged branching groups, wherein the association between the carrier and the biologically active protein is non-covalent.

68. A method according to claim 66 wherein the composition provides greater transdermal delivery of the biologically active protein relative to the agent in the absence of the carrier.

69. A method according to claim 68 in which the biologically active protein has therapeutic activity.

70. A method according to claim 69 in which the therapeutic protein excludes insulin, botulinum toxins, VEGF, and antibody fragments.

71. A method according to claim 69 in which the therapeutic protein does not therapeutically alter blood glucose levels.

72. A method according to claim 69 in which the therapeutic protein excludes a botulinum toxin.

73. A method according to claim 69 in which the therapeutic protein excludes antibody fragments.

74. A method according to claim 69 in which the therapeutic protein excludes VEGF.

75. A method of administering a non-protein non-nucleotide biologically active agent to a subject comprising topically applying to the skin or epithelium of the subject the biologically active agent in conjunction with an effective amount of a carrier comprising a polymeric backbone having attached positively charged branching groups, wherein the association between the carrier and the biologically active agent is non-covalent.

76. A method according to claim 75 wherein the composition provides greater transdermal delivery of the biologically active agent relative to the agent in the absence of the carrier.

77. A method according to claim 76 in which the biologically active agent has a therapeutic activity.

78. A method according to claim 75 in which the biologically active protein and carrier are administered to the subject in a composition containing both components.

79. A method according to claim 75 in which the biologically active protein and carrier are administered separately to the subject.

80. A method according to claim 77 in which the biologically active protein and carrier are administered to the subject in a composition containing both components.

81. A method according to claim 77 in which the biologically active agent and carrier are administered separately to the subject.

82. A method according to claim 75 in which the composition is a controlled release composition.

83. A method according to claim 77 in which the composition is a controlled release composition.

84. A method according to claim 75 in which the non-protein non-nucleotide biologically active agent is antifungal agent.

85. A composition according to claim 33 in which a biologically active agent is an antifungal agent.

86. A composition according to claim 85 containing from about 1×10^{-10} to about 49.9 weight % of the biologically active agent and from about 1×10^{-9} to about 50 weight % of the carrier.

87. A controlled release composition according to claim 85.

88. A composition according to claim 85 in which the antifungal agent is selected from amphotericin B, fluconazole, flucytosine, itraconazole, ketoconazole, clotrimazole, econazole, griseofulvin, miconazole, nystatin, ciclopirox and the like.

89. A kit for administration of a non-protein non-nucleotide biologically active agent to a subject comprising a device for delivering the agent to the skin or epithelium of the subject and a composition according to claim 33.

90. A kit according to claim 89 further comprising a custom applicator.

91. A kit according to claim 89 in which the agent is an antifungal agent and the composition is contained in a device for administering an antifungal agent to a subject via the nail plate or adjacent anatomic structures.

92. A kit according to claim 89 in which the device is a prosthetic nail plate or lacquer.

93. A method according to claim 75 in which the biologically active agent is an agent for treating or preventing symptoms of psoriasis.

94. A method according to claim 84 in which an antifungal agent and carrier are administered to the subject in a composition containing both components.

95. A method according to claim 84 in which the antifungal agent and carrier are administered separately to the subject.

96. A method according to claim 84 in which the composition is a controlled release composition.

97. A method according to claim 84 in which the antifungal agent is selective from amphotericin B, fluconazole, flucytosine, itraconazole, ketoconazole, clotrimazole, econazole, griseofulvin, miconazole, nystatin, ciclopirox and the like.

98. A method according to claim 84 in which the antifungal agent is administered to treat the symptoms and signs of a fungal infection.

99. A method according to claim 84 in which the antifungal agent is administered to alter symptoms or signs of fungal infection of the nail plate or nail bed.

100. A composition comprising an antigen suitable for immunization and a carrier which comprises a polymeric backbone having attached positively charged branching groups and which is present in an effective amount for transdermal delivery, wherein the association between the carrier and the antigen is non-covalent.

101. A composition according to claim 100 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide.

102. A composition according to claim 101 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide having a molecular weight of from about 10,000 to about 1,500,000.

103. A composition according to claim 101 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide having a molecular weight of from about 25,000 to about 1,200,000.

104. A composition according to claim 101 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide having a molecular weight of from about 100,000 to about 1,000,000.

105. A composition according to claim 101 in which the backbone comprises a positively charged polylysine.

106. A composition according to claim 105 in which the backbone comprises a positively charged polylysine having a molecular weight of from about 10,000 to about 1,500,000.

107. A composition according to claim 105 in which the backbone comprises a positively charged polylysine having a molecular weight of from about 25,000 to about 1,200,000.

108. A composition according to claim 105 in which the backbone comprises a positively charged polylysine having a molecular weight of from about 100,000 to about 1,000,000.

109. A composition according to claim 100 in which the backbone comprises a positively charged nonpeptidyl polymer.

110. A composition according to claim 109 in which the nonpeptidyl polymer backbone comprises a positively charged polyalkyleneimine.

111. A composition according to claim 110 in which the polyalkyleneimine is a polyethyleneimine.

112. A composition according to claim 111 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 10,000 to about 2,500,000.

113. A composition according to claim 111 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 100,000 to about 1,800,000.

114. A composition according to claim 111 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 500,000 to about 1,400,000.

115. A composition according to claim 100 in which the carrier comprises a polymeric backbone having attached positively charged branching groups selected from $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT and fragments thereof, and Antennapedia PTD, in which the subscript $n1$ is an integer of from 0 to about 20, and the subscript $n2$ is independently an odd integer of from about 5 to about 25.

116. A composition according to claim 115 in which the positively charged branching groups are selected from groups having the formula $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$.

117. A composition according to claim 116 in which the subscript $n1$ is an integer of from about 1 to about 8.

118. A composition according to claim 116 in which the subscript $n1$ is an integer of from about 2 to about 5.

119. A composition according to claim 116 in which the subscript $n2$ is an odd number of from about 7 to about 17.

120. A composition according to claim 116 in which the subscript $n2$ is an odd number of from about 7 to about 13.

121. A composition according to claim 115 in which the branching groups are selected from HIV-TAT and fragments thereof.

122. A composition according to claim 121 in which the attached positively-charged branching groups are HIV-TAT fragments that have the formula $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$, or $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$ wherein the subscripts p and q are each independently an integer of from 0 to 20.

123. A composition according to claim 115 in which the branching groups are Antennapedia PTD groups.

124. A composition according to claim 115 in which the positively charged polymer comprises a polypeptide.

125. A composition according to claim 124 in which the polypeptide is selected from polylysines, polyarginines, polyornithines, and polyhomoarginines.

126. A composition according to claim 125 in which the polypeptide is a polylysine.

127. A composition according to claim 115 in which the polymer comprises a positively charged nonpeptidyl polymer.

128. A composition according to claim 127 in which the nonpeptidyl polymer comprises a positively charged polyalkyleneimine.

129. A composition according to claim 128 in which the polyalkyleneimine is a polyethyleneimine.

130. A composition according to claim 100 containing from about 1×10^{-10} to about 49.9 weight % of the antigen and from about 1×10^{-9} to about 50 weight % of the carrier.

131. A controlled release composition according to claim 100.

132. A composition according to claim 100 in which the antigen excludes insulin, botulinum toxins, VEGF, and antibody fragments. ...

133. A composition according to claim 100 in which the antigen is suitable for childhood immunizations.

134. A kit for administration of an antigen suitable for immunization to a subject comprising a device for delivering the antigen suitable for immunization to the skin or epithelium and a composition comprising a carrier consisting of a polymeric backbone having attached positively charged branching groups selected from $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT and fragments thereof, and Antennapedia PTD, in which the subscript $n1$ is an integer of from 0 to about 20, and the subscript $n2$ is independently an odd integer of from about 5 to about 25, wherein the association between the carrier and the antigen is non-covalent.

135. A kit for administration of an antigen suitable for immunization to a subject comprising a device for delivering the antigen to the skin or epithelium and a composition according to claim 100.

136. A kit according to claim 134 further comprising a custom applicator.

137. A kit according to claim 134 in which the composition is contained in a device for administering an antigen suitable for immunization to a subject via the skin or epithelium.

138. A kit according to claim 134 in which the device is applied topically.

139. A kit according to claim 134 in which the device is a skin patch.

140. A method of administering an antigen suitable for immunization to a subject comprising topically applying to the skin or epithelium of the subject the antigen

suitable for immunization in conjunction with an effective amount of a carrier comprising a polymeric backbone having attached positively charged branching groups, wherein the association between the carrier and the antigen is non-covalent.

141. A method according to claim 140 in which the antigen suitable for immunization and carrier are administered to the subject in a composition containing both components.

142. A method according to claim 140 in which the antigen suitable for immunization and carrier are administered separately to the subject.

143. A method according to claim 140 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide.

144. A method according to claim 143 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide having a molecular weight of from about 10,000 to about 1,500,000.

145. A method according to claim 143 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide having a molecular weight of from about 25,000 to about 1,200,000.

146. A method according to claim 143 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide having a molecular weight of from about 100,000 to about 1,000,000.

147. A method according to claim 143 in which the backbone comprises a positively charged polylysine.

148. A method according to claim 147 in which the backbone comprises a positively charged polylysine having a molecular weight of from about 10,000 to about 1,500,000.

149. A method according to claim 147 in which the backbone comprises a positively charged polylysine having a molecular weight of from about 25,000 to about 1,200,000.

150. A method according to claim 147 in which the backbone comprises a positively charged polylysine having a molecular weight of from about 100,000 to about 1,000,000.

151. A method according to claim 140 in which the backbone comprises a positively charged nonpeptidyl polymer.

152. A method according to claim 151 in which the nonpeptidyl polymer backbone comprises a positively charged polyalkyleneimine.

153. A method according to claim 152 in which the polyalkyleneimine is a polyethyleneimine.

154. A method according to claim 153 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 10,000 to about 2,500,000.

155. A method according to claim 153 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 100,000 to about 1,800,000.

156. A method according to claim 153 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 500,000 to about 1,400,000.

157. A method according to claim 140 in which the carrier comprises a polymeric backbone having attached positively charged branching groups selected from $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT and fragments thereof, and Antennapedia PTD, in which the subscript $n1$ is an integer of from 0 to about 20, and the subscript $n2$ is independently an odd integer of from about 5 to about 25.

158. A method according to claim 157 in which the positively charged branching groups are selected from groups having the formula $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$.

159. A method according to claim 158 in which the subscript $n1$ is an integer of from about 1 to about 8.

160. A method according to claim 158 in which the subscript $n1$ is an integer of from about 2 to about 5.

161. A method according to claim 158 in which the-subscript $n2$ is an odd number of from about 7 to about 17.

162. A method according to claim 158 in which the subscript $n2$ is an odd number of from about 7 to about 13.

163. A method according to claim 157 in which the branching groups are selected from HIV-TAT and fragments thereof.

164. A method according to claim 163 in which the attached positively-charged branching groups are HIV-TAT fragments that have the formula $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$, or $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$ wherein the subscripts p and q are each independently an integer of from 0 to 20.

165. A method according to claim 157 in which the branching groups are Antennapedia PTD groups.

166. A method according to claim 157 in which the positively charged polymer comprises a polypeptide.

167. A method according to claim 166 in which the polypeptide is selected from polylysines, polyarginines, polyornithines, and polyhomoarginines.

168. A method according to claim 167 in which the polypeptide is a polylysine.

169. A method according to claim 157 in which the polymer comprises a positively charged nonpeptidyl polymer.

170. A method according to claim 169 in which the nonpeptidyl polymer comprises a positively charged polyalkyleneimine.

171. A method according to claim 170 in which the polyalkyleneimine is a polyethyleneimine.

172. A method according to claim 140 in which the composition is a controlled release composition.

173. A method according to claim 140 in which the antigen suitable for immunization excludes insulin, botulinum toxins, VEGF, and antibody fragments.

174. A method according to claim 140 in which the antigen is suitable for childhood immunizations.

175. A method according to claim 140 in which the antigen suitable for immunization is administered to provide resistance to an environmental antigen.

176. A method according to claim 140 in which the antigen suitable for immunization is administered to provide resistance to a potential pathogen

177. A method according to claim 140 in which the antigen suitable for immunization is administered to provide resistance to a potential biohazard.

178. A composition comprising an imaging moiety and a targeting agent and a carrier which comprises a polymeric backbone having attached positively charged branching groups and which is present in an effective amount for transdermal delivery, wherein the association between the carrier and the imaging moiety or targeting agent is non-covalent.

179. A composition according to claim 178 in which the imaging agent is an optical imaging agent.

180. A composition according to claim 179 in which the imaging agent is selected from Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, Oregon green 488, Oregon green 500, Oregon, green 514, Green fluorescent protein, 6-FAM, Texas Red, Hex, TET, and HAMRA.

181. A composition according to claim 178 in which the imaging agent is suitable for magnetic resonance imaging.

182. A composition according to claim 178 in which the targeting agent recognizes melanoma.

183. A kit for administration of a composition according to claim 178 to a subject comprising a device for delivering the imaging and targeting moieties and a carrier which comprises a polymeric backbone having attached positively charged branching groups and which is present in an effective amount for transdermal delivery.

184. A method of administering an imaging moiety and a targeting agent to a subject comprising topically applying to the skin or epithelium of the subject the imaging moiety and targeting agent in conjunction with an effective amount of a carrier comprising a polymeric backbone having attached positively charged branching groups, wherein the association between the carrier and the biologically active protein is non-covalent.

185. A method according to claim 184 in which the imaging agent is an optical imaging agent.

186. A method according to claim 185 in which the imaging agent is selected from Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, Oregon green 488, Oregon green 500, Oregon, green 514, Green fluorescent protein, 6-FAM, Texas Red, Hex, TET, and HAMRA.

187. A method according to claim 184 in which the imaging agent is suitable for magnetic resonance imaging.

188. A method according to claim 184 in which the targeting agent recognizes melanoma.

189. A method according to claim 184 in which the composition is applied for screening of patients at risk for melanoma.

190. A method according to claim 184 in which the composition is applied to aid surgical excision of melanoma.

191. A method according to claim 184 in which the composition is applied in conjunction with photographic techniques or image analysis techniques.

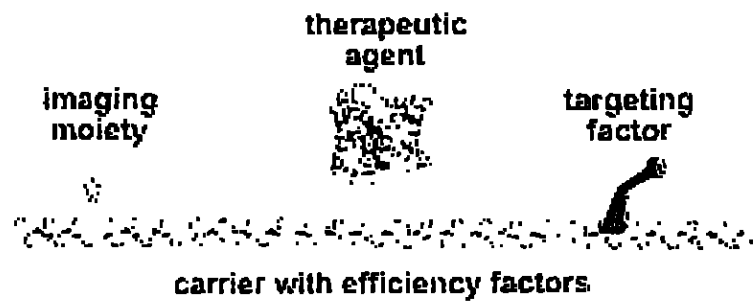


FIGURE 1

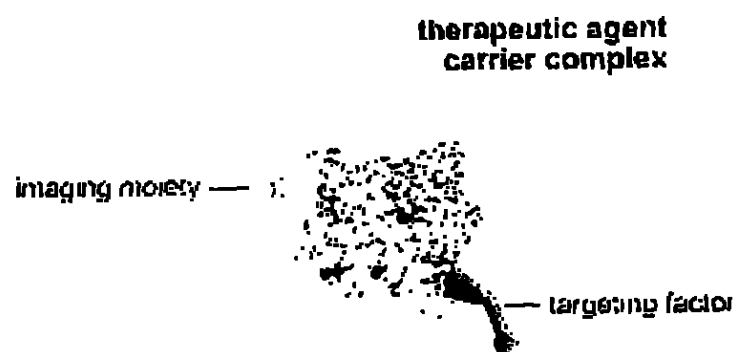


FIGURE 2

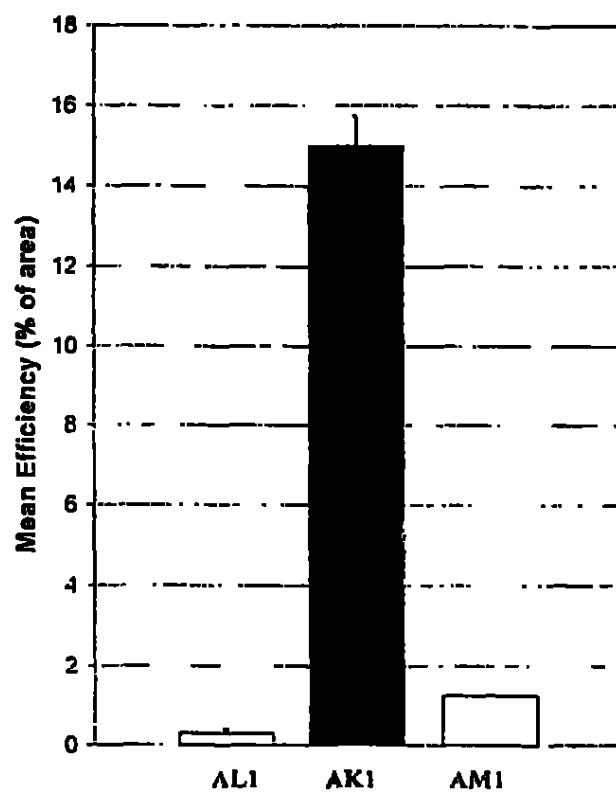


FIGURE 3 (% of cells showing positive)

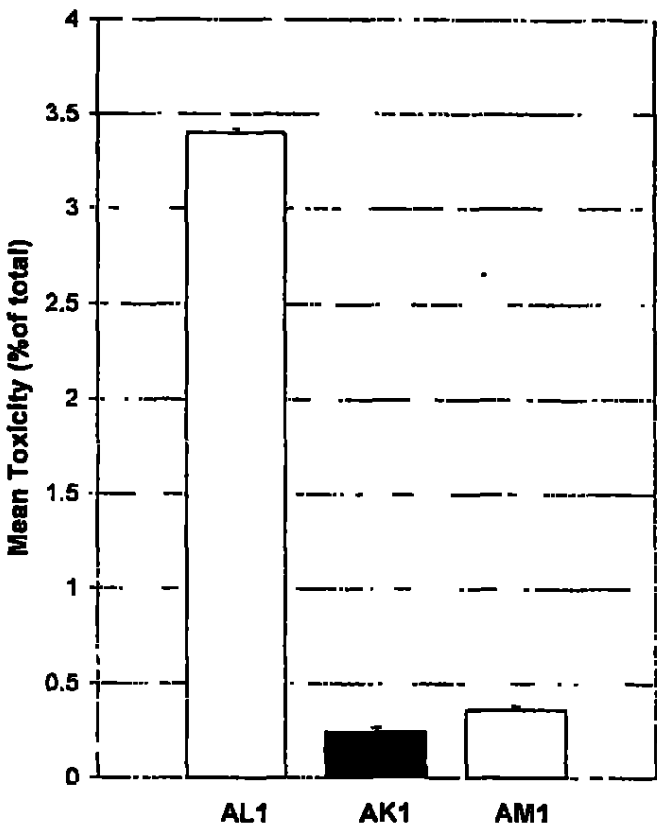


FIGURE 4 (mean nonviable cells, %)

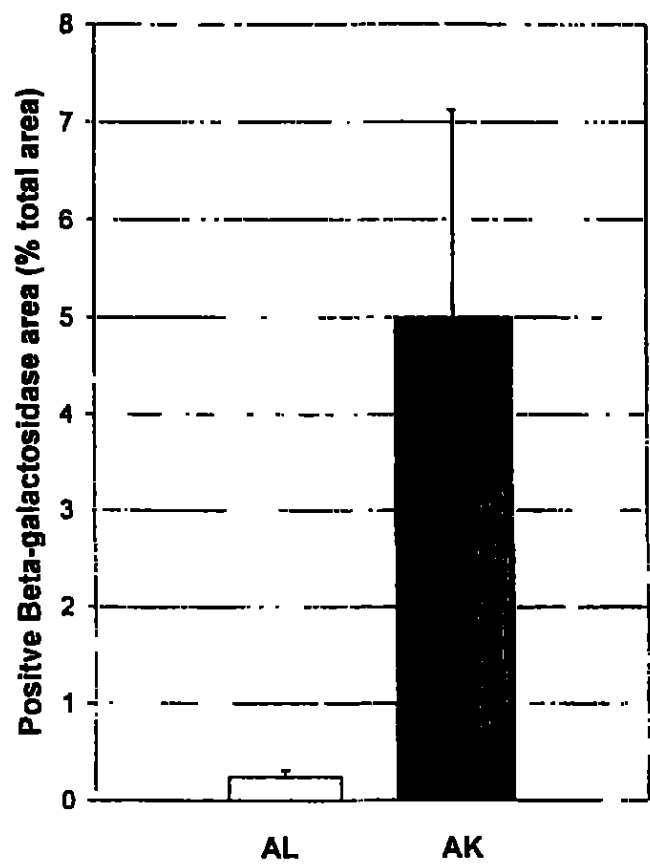


FIGURE 5 (7 days of once-daily administration)

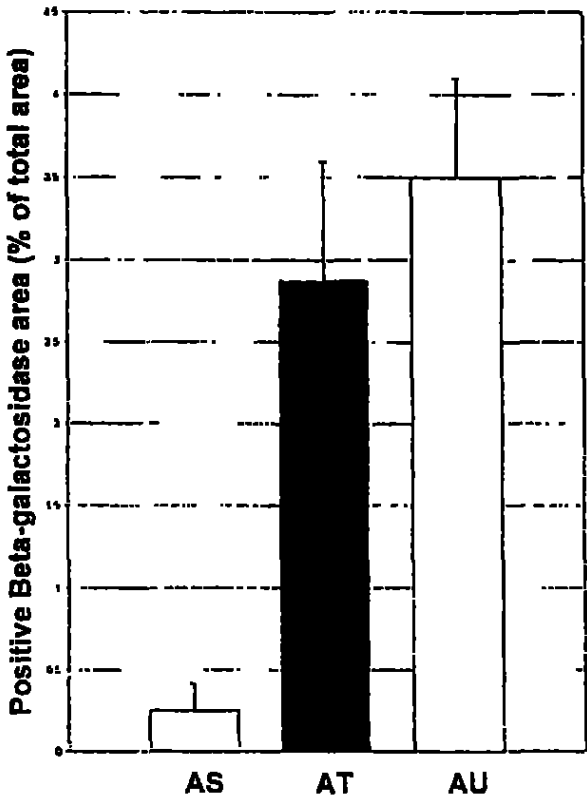


FIGURE 6 (transdermal delivery efficiency)

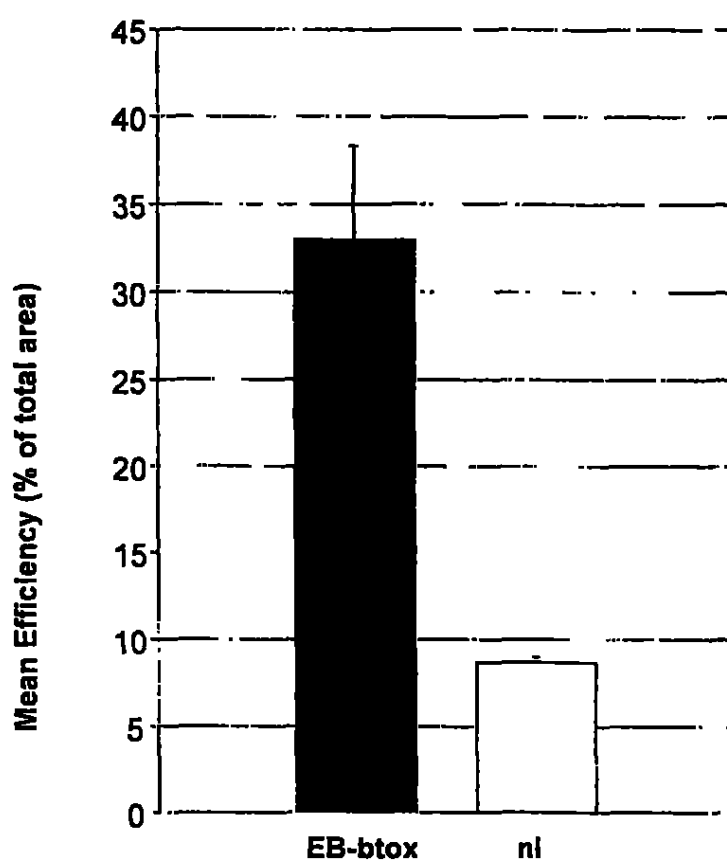


FIGURE 7 (efficiency of transdermal delivery)

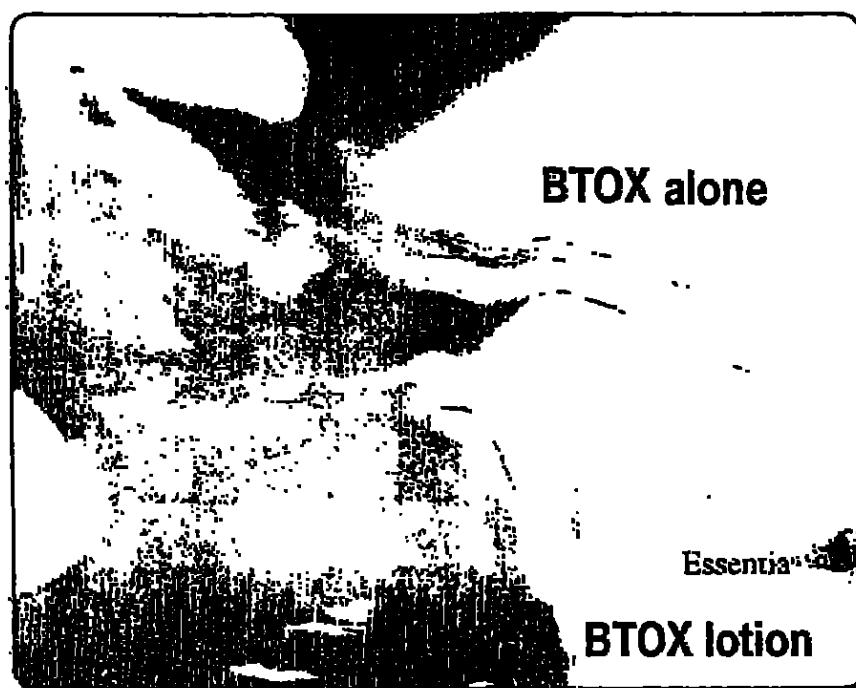


FIGURE 8

FIGURE 9A

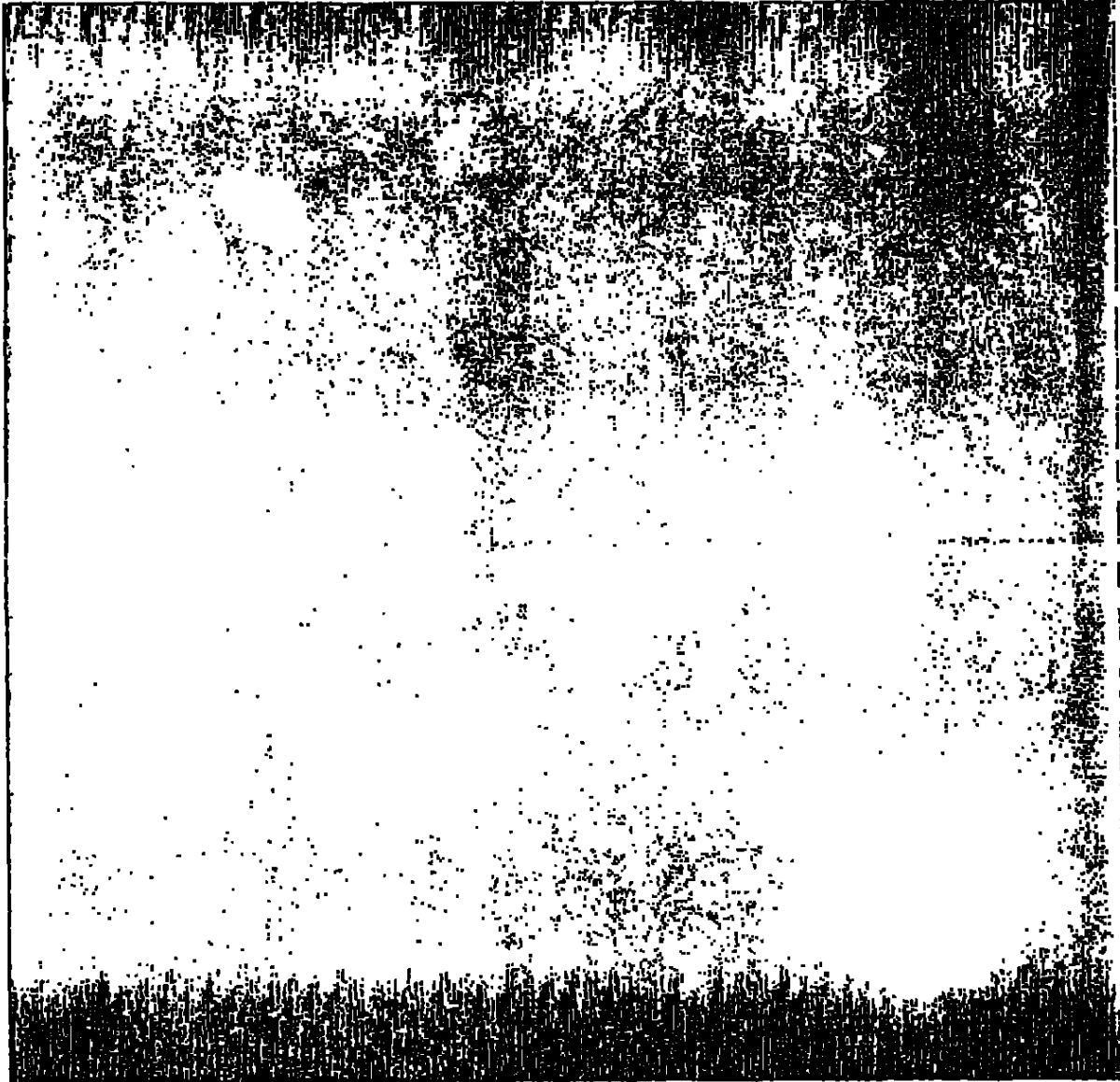


FIGURE 9B

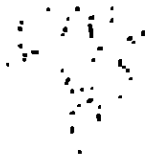


FIGURE 9C

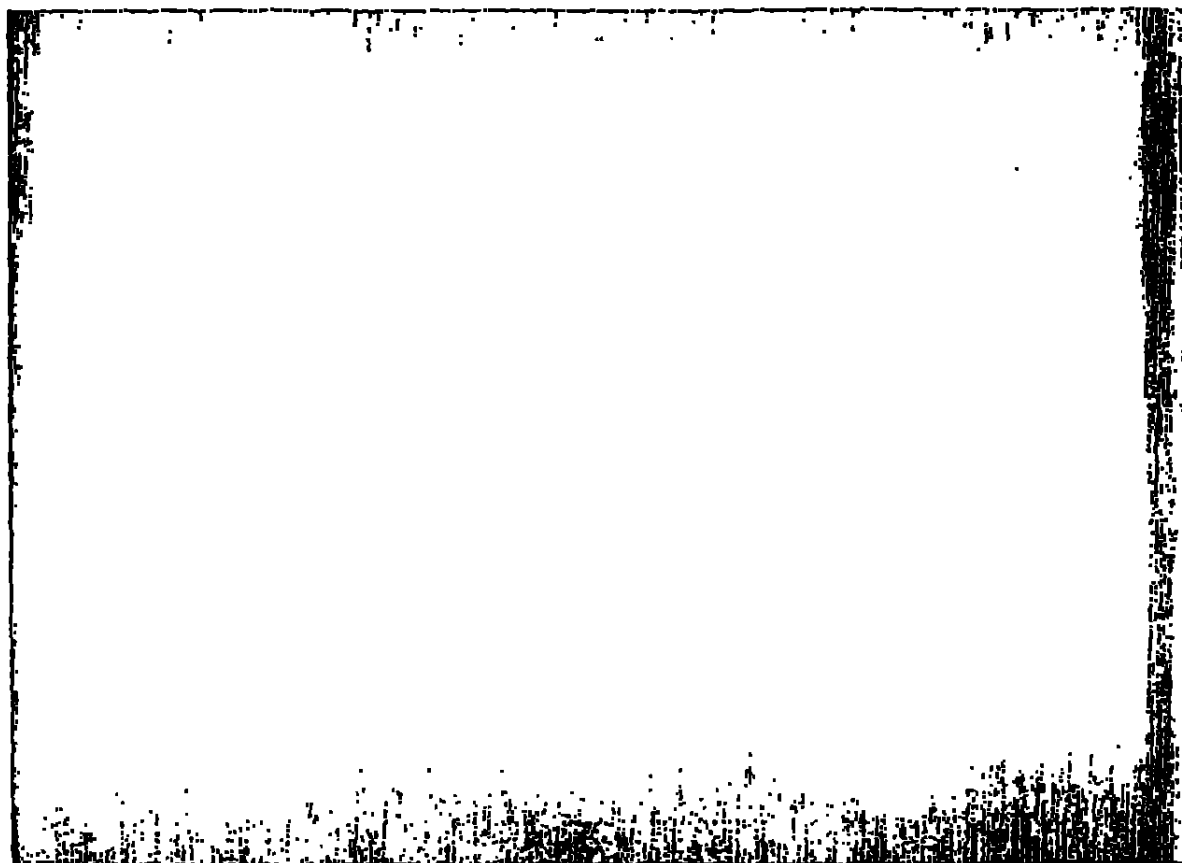


FIGURE 9D

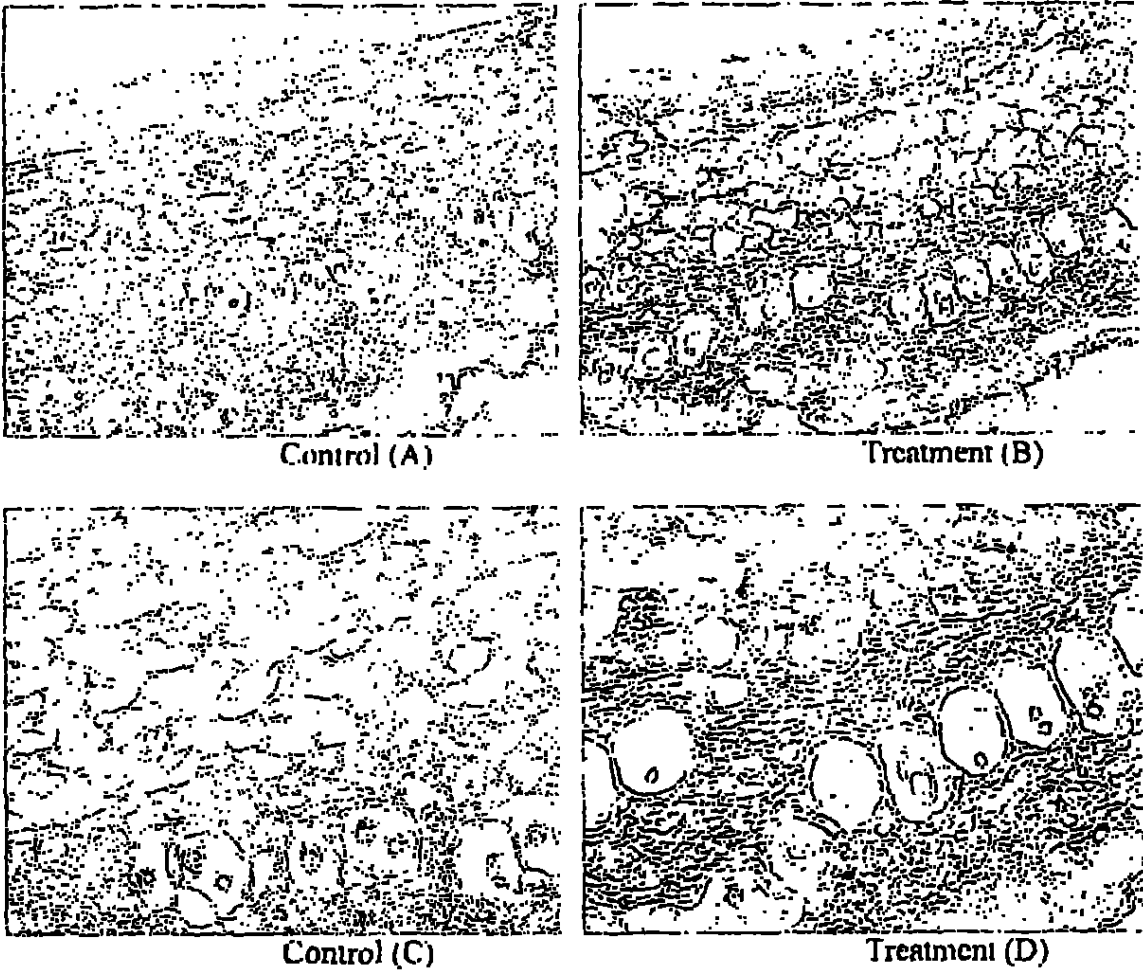


FIGURE 10a

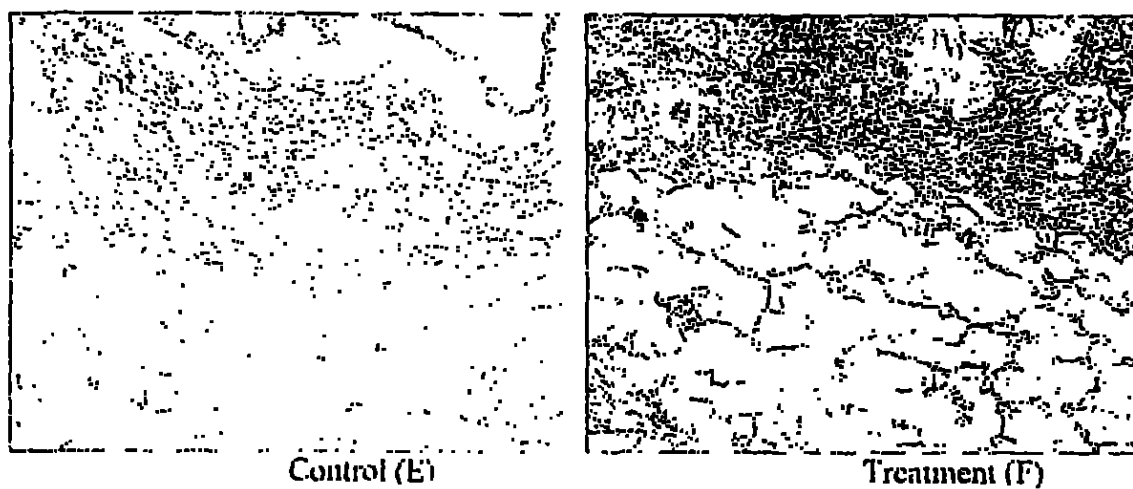


FIGURE 10b

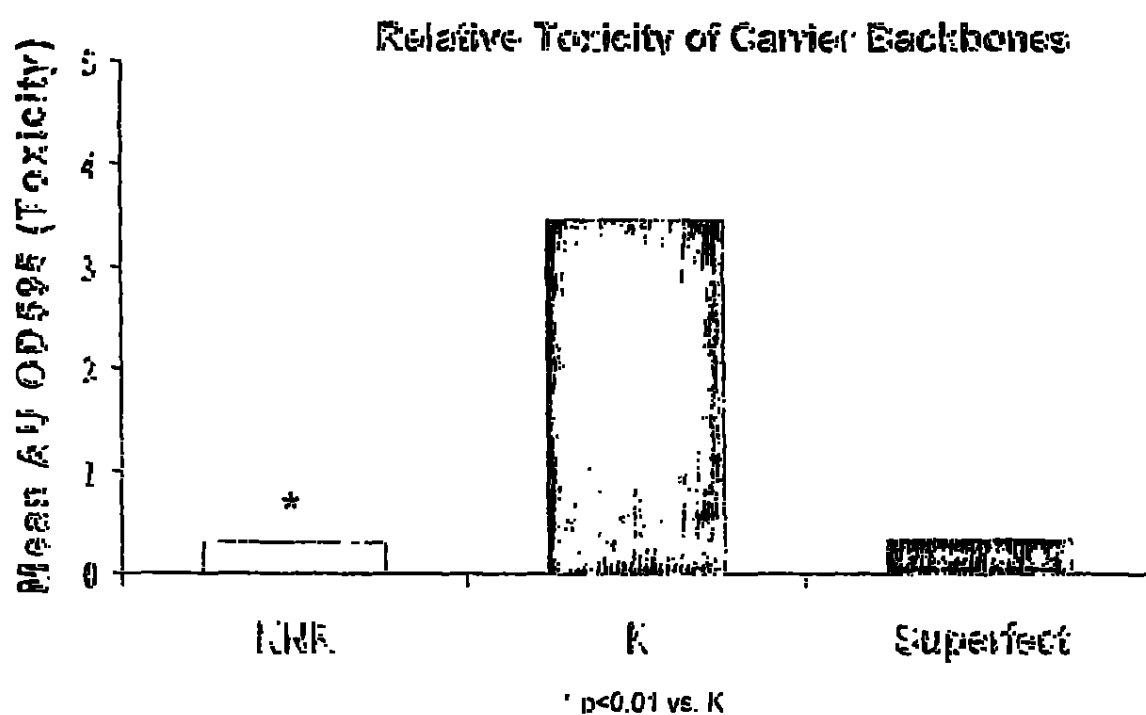


FIGURE 11

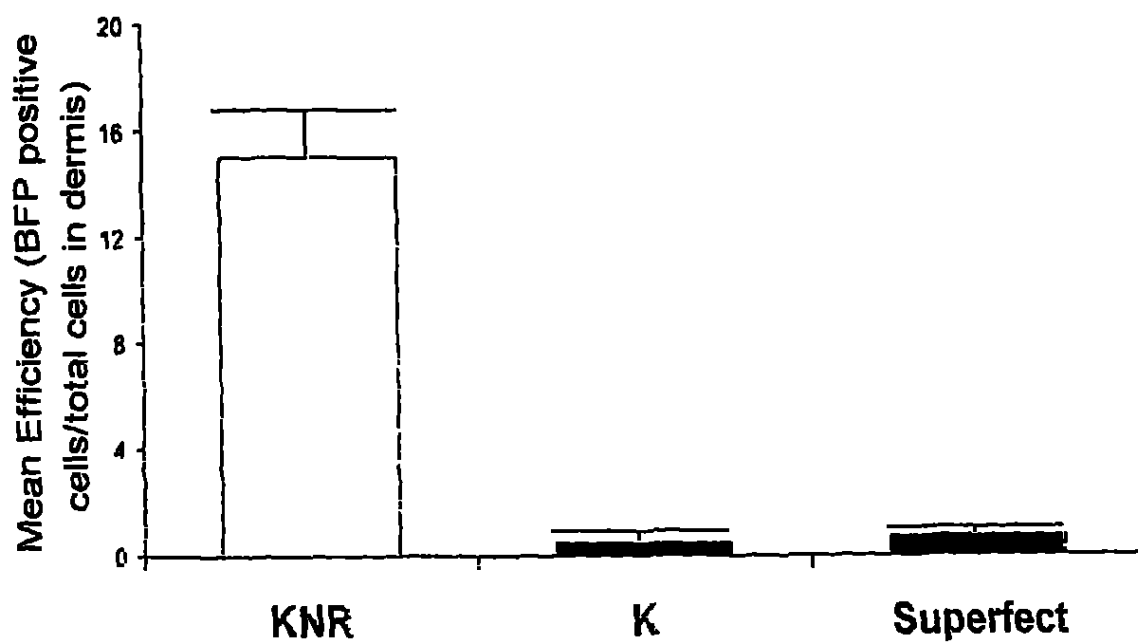
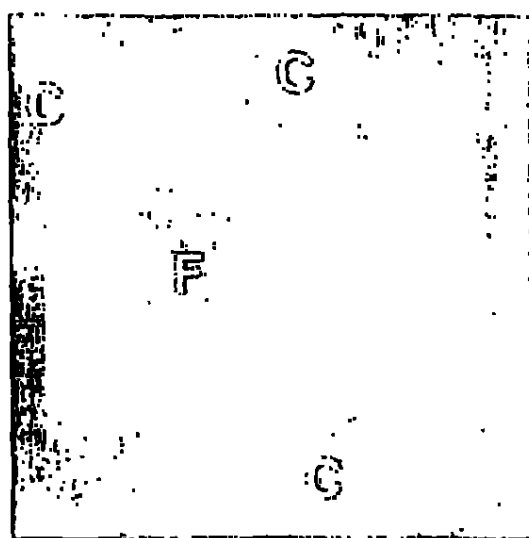


FIGURE 12



PANEL A



PANEL B

FIGURE 13

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO TÓPICO Y
TRANSPORTE TERAPÉUTICO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional Estadounidense No. serie 60/550, 014, presentada en marzo 3, 2004, los contenidos de los cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

**DECLARACIÓN EN CUANTO A DERECHOS A LAS INVENCIONES HECHAS
BAJO INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO PATROCINADA FEDERALMENTE**

[0002] No aplicable.

ANTECEDENTE DE LA INVENCIÓN

[0003] La piel protege los órganos del cuerpo de las amenazas ambientales externas y actúa como un termostato para mantener la temperatura corporal. Esta consiste de varias capas diferentes, cada una con funciones especializadas. Las capas mayores incluyen la epidermis, la dermis, y la hipodermis. La epidermis es una capa estratificada de células epiteliales que recubre la dermis, que consiste de tejido conector. La epidermis y la dermis se soporta adicionalmente por la hipodermis, una capa interna de tejido adiposo.

[0004] La epidermis, la capa más superior de la piel, es de solo 0.1 a 1.5 milímetros de espesor (Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society, 1-7 (1998)). Esta consiste de queratinocitos y se divide en varias capas basado en

su estado de diferenciación. La epidermis se puede clasificar adicionalmente en estrato córneo y la epidermis viable, que consiste de las células basales y granulares de melpigio. El estrato córneo es higroscópico y requiere al menos 10% de humedad por peso para mantener su flexibilidad y suavidad. La higroscopicidad es atribuible en parte a la capacidad para retener agua de la queratina. Cuando las capas córneas pierden su suavidad y flexibilidad esta se vuelve áspera y quebradiza, resultando en piel seca.

[0005] La dermis, que descansa justo por debajo de la epidermis, es de 1.5 a 4 milímetros de grueso. Es la más gruesa de las tres capas de la piel. Adicionalmente, la dermis también aloja la mayoría de estructuras de la piel, que incluyen glándulas sudoríparas y aceitosas (que secretan sustancias a través de las aberturas en la piel llamadas poros o comedones) folículos pilosos, terminaciones nerviosas, y vasos sanguíneos y linfáticos (Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society, 1-7 (1998)). Sin embargo, los componentes principales de la dermis son el colágeno y la elastina.

[0006] La hipodermis es la capa más profunda de la piel. Esta actúa como un aislador para la conservación del calor corporal y como un absorbente de golpes para la protección de órganos (Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society, 1-7 (1998)). Adicionalmente, la hipodermis también almacena grasa para reserva de energía. El pH de la piel está normalmente entre 5 y 6. Esta acidez se debe a la presencia de aminoácidos anfotéricos, ácido láctico y ácidos grasos de las secreciones de las glándulas sebáceas. El término "manto ácido" se refiere a la presencia de sustancias solubles en agua en la mayoría de regiones de la piel. La capacidad amortiguadora de la piel se debe en parte a estas secreciones almacenadas en la capa córnea de la piel.

[0007] Las arrugas, uno de los signos indicadores de envejecimiento, se puede originar por cambios bioquímicos, histológicos, y fisiológicos que se acumulan del daño por el medio ambiente (Benedetto, International Journal of Dermatology, 38:641-655 (1999)). Adicionalmente, existen otros factores secundarios que pueden originar pliegues característicos, surcos e incrementar las arrugas faciales (Stegman et al., The skin of the Aging FACE Cosmetic Dermatological Surgery, 2nd ed-. St Louis, MO: Mosby Year Book: 5-15 (1990)). Estos factores secundarios incluyen el constante halado de la gravedad, frecuente y constante presión posicional sobre la piel (es decir, durante el sueño), y movimientos faciales repetidos originados por contracción de los músculos faciales (Stegman et al., The skin of the Aging FACE Cosmetic Dermatological Surgery, 2nd ed-. St Louis, MO: Mosby Year Book: 5-15 (1990)). Diferentes técnicas se han utilizado con el fin de suavizar algunos de los signos de envejecimiento. Estas técnicas varían desde humectantes faciales que contienen ácidos alfa hidroxí y retinol a procedimientos quirúrgicos e inyecciones de neurotoxinas.

[0008] Una de las principales funciones de la piel es suministrar una barrera al transporte de agua y sustancias potencialmente dañinas para la homeostasis normal. El cuerpo podría rápidamente deshidratarse sin una piel semipermeable coriácea. La piel ayuda a evitar la entrada de sustancias dañinas en el cuerpo. Aunque la mayoría de sustancias no puede penetrar la barrera, un número de estrategias se han desarrollado para incrementar selectivamente la permeabilidad de la piel con éxito variable.

[0009] En razón a que el agente terapéutico de no nucleótido no proteína tal como antifúngicos no pueden penetrar eficientemente la piel, con el fin de

suministrar los efectos terapéuticos de los agentes antifúngicos, esta se debe inyectar actualmente en la piel o administrar sistemáticamente. La administración federal de drogas y alimentos ha aprobado tal un procedimiento, para el tratamiento de la infección fúngica. En tales tratamientos, el agente antifúngico se administra por dosis o inyección monitoreada. Sin embargo, tal tratamiento puede originar efectos colaterales adversos. La aplicación tópica de agentes antifúngicos provee un suministro local para un tratamiento alternativo deseable seguro debido a la naturaleza indolora de la aplicación incolora, tratamiento reducido para aplicar el terapéutico antifúngico, dosis más pequeñas necesarias para afectar y alcanzar un resultado clínico terapéutico y limitar efectos colaterales típicamente asociados con el suministro sistémico.

[00010] En razón a que los agentes antigénicos adecuados para la inmunización no pueden penetrar eficientemente la piel, con el fin de suministrar los efectos terapéuticos de agentes antigénicos adecuados para inmunización la toxina se debe inyectar actualmente en la piel. La administración federal de drogas y alimentos ha aprobado tal un procedimiento para tratamiento de por ejemplo, malaria, rabia, ántrax. Tuberculosis o inmunizaciones relacionadas con niños tales como hepatitis B, difteria, pertusis, tétano, hemofilia influenza tipo B, poliovirus inactivado, paperas, sarampión, rubéola, varicela, neumococo, hepatitis A e influenza. En tales tratamientos, el agente antigénico para inmunización se administra mediante inyección monitoreada. Sin embargo, tal tratamiento puede no ser confortable y más típicamente involucra algún dolor. La aplicación tópica de agente antigénico para inmunización suministra un tratamiento alternativo seguro y más deseable debido a la naturaleza indolora de la aplicación, el área de superficie de tratamiento mayor que se puede cubrir, entrenamiento reducido para

aplicar el terapéutico, dosis más pequeñas necesarias para afectar y alcanzar un resultado terapéutico clínico.

[0011] La suministro transdérmico de otros terapéuticos es también un área de gran interés debido, por ejemplo, al potencial para reducir la falta de confort del paciente, la administración directa de agentes terapéuticos dentro del torrente sanguíneo, y las oportunidades para suministro monitoreado por vía del uso de dispositivos contruidos especialmente y/o de formulaciones de liberación controlada y técnicas.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0012] La presente invención suministra nuevos métodos y composiciones que son ampliamente aplicables a composiciones y diversos agentes terapéuticos o cosméticos que se pueden objetivar o imaginar para maximizar el suministro a un sitio particular.

[0013] Esta invención se adiciona adicionalmente con formulaciones para suministro transdérmico de proteínas diferentes a la insulina, toxina botulinum, fragmentos de anticuerpos, y VEGF – preferiblemente aquellas que tienen un peso molecular menor de 20,000 kD. Tales agentes basados en proteínas pueden incluir, por ejemplo, un antígeno adecuado para inmunización. En otro aspecto de la presente invención se relaciona con formulaciones para el suministro transdérmico de agentes terapéuticos no nucleótidos no proteína tales como por ejemplo ciertos antifúngicos. La invención excluye específicamente insulina, toxinas botulinum, VEGA y fragmentos de anticuerpo en donde se emplea el término "terapéutico" o "proteína biológicamente activa". En razón a que los

antígenos adecuados para inmunización tienen otras actividades biológicas tales como montaje de una respuesta inmune, estas permanecen incluidas en los aspectos apropiados de esta invención, sin embargo.

[0014] Esta invención se relaciona adicionalmente con formulaciones para suministro transdérmico de un agente terapéutico no nucleótido no proteína tal como antifúngicos. Agentes antifúngicos adecuados incluyen, por ejemplo, anfoterisina B, fluconazol, flucitocina, itraconazol, crotimazol, heconozol, gríceofulvina, miconazol, nistatina, o ciclopirox y similares.

[0015] Esta invención se relaciona adicionalmente con formulaciones para el suministro transdérmico de agentes antigénicos adecuados para inmunización que pueden ser antígenos basados en proteína, agentes no nucleótidos no proteína o híbridos de estos. Agentes adecuados incluyen, por ejemplo, aquellos para agentes ambientales, patógenos o biorriesgosos. Agentes adecuados incluyen preferiblemente, por ejemplo, malaria, rabia, ántrax, tuberculosis, o inmunizaciones relacionadas con niños tal como hepatitis B, difteria, pertusis, tétano, hemofilia influenza tipo B, poliovirus inactivado, paperas, sarampión, rubéola, varicela, neumococos, hepatitis A e influenza.

[0016] Debido a que los antígenos adecuados para inmunización tienen otras actividades biológicas como montaje de una respuesta inmune, estas permanecen incluidas en los aspectos apropiados de esta invención, sin embargo. Agentes que no cruzan fácilmente la piel pero son sustancialmente más pequeños que por ejemplo la insulina – más preferiblemente agentes menores que 20,000 kD- o que tienen diferentes propiedades fisicoquímicas se pueden suministrar a través de a otro aspecto de esta invención. Específicamente, los antígenos

deseables para inmunizaciones de pueden transportar a través de la piel sin inyección a través de la presente invención. El resultado produce una alternativa libre de inyección para inmunización de niños o biorriesgos potencialmente importantes o peligros ambientales. Adicionalmente, terapéuticos no nucleótidos no proteína tales como ciertos de los agentes antifúngicos, por ejemplo, se han caracterizado por pobre penetración tópica particularmente para infecciones fúngicas tales como oncomicosis o infección de la uña del dedo y placas de uñas.

[0017] De acuerdo con lo anterior esta invención de relaciona adicionalmente con formulaciones tópicas para suministro transdérmico de sustancias terapéuticas y diagnósticas, que incluyen proteínas particularmente aquellas que tienen un peso molecular de menos de 20,000 kD- u otro agente biológicamente activo tal como, por ejemplo, un agente terapéutico no nucleótido no proteína tal como ciertos antifúngicos o alternativamente un agente para inmunización. En razón a antígenos adecuados par a la inmunización que tienen otras actividades biológicas tales como montaje de una respuesta inmune, estas permanecen incluidas en los aspectos apropiados de esta invención, sin embargo. Agentes antifúngicos adecuados, por ejemplo, anfoterisina B, fluconazol, flucitocina, itraconazol, quetaconazol, crotimazol, econazol, griseofulvina, miconazol, nistatina o ciclopirox y similares. Agentes adecuados incluyen preferiblemente, por ejemplo, malaria, rabia, ántrax, tuberculosis o relacionada con inmunizaciones de niños tales como hepatitis B, difteria, pertusis, tétanos, hemófilos influenza tipo B, polivirus inactivo, paperas, sarampión, rubéola, varicela, neumococos, hepatitis A e influenza.

[0018] Esta invención suministra una composición que tiene una proteína biológicamente activa y un portador. El portador incluye una estructura polimérica

que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente y está presente en una cantidad efectiva para suministro transdérmico. La asociación entre el portador y la proteína biológicamente activa no es covalente.

[0019] Otro objeto de esta invención es suministrar una composición que contiene un agente biológicamente activo no nucleótido no proteína y un portador. El portador incluye una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente y está presente en una cantidad efectiva para suministro transdérmico. La asociación entre el portador y la proteína biológicamente activa no nucleótido no proteína no es covalente.

[0020] Aun otro objeto de la invención es suministrar un kit para administración de una proteína biológicamente activa a un sujeto. El kit incluye un dispositivo para suministrar la proteína biológicamente activa a la piel o epitelio del sujeto y una composición que tiene un portador polimérico con grupos ramificados adheridos cargados positivamente. Los grupos ramificados cargados positivamente se pueden seleccionar de $-(\text{gly})_{n1} - (\text{arg})_{n2}$ HIV-TAT y fragmentos de estos, y Antennapedia PTD y fragmentos de estos, en donde el subíndice $n1$ es un entero que va de 0 a aproximadamente 20 y el subíndice $N2$ es independientemente un entero impar que va de cerca de 5 a aproximadamente 25. La asociación entre el portador y la proteína biológicamente activa no es covalente.

[0021] Esta invención también suministra un método para administrar una proteína biológicamente activa a un sujeto. El método incluye aplicar tópicamente a la piel o epitelio del sujeto la proteína en conjunto con una cantidad efectiva de un portador. El portador incluye una estructura polimérica que tiene grupos

ramificados adheridos cargados positivamente. La asociación entre el portador y la proteína biológicamente activa no es covalente.

[0022] Adicionalmente, la invención suministra un método para administrar un agente biológicamente activo no nucleótido no proteína a un sujeto. El método incluye aplicar tópicamente a la piel o epitelio del sujeto el agente biológicamente activo en conjunto con una cantidad efectiva de un portador. El portador puede incluir una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente. La asociación entre el portador y el agente biológicamente activo no es covalente.

[0023] Un objeto de esta invención es suministrar una composición que contiene un antígeno adecuado para inmunización y un portador. El portador incluye una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente y está presente en una cantidad efectiva para suministro transdérmico. La asociación entre el portador y el antígeno no es covalente. Otro objeto de esta invención es proporcionar un kit para administración de un antígeno adecuado para inmunización para un sujeto. El kit incluye un dispositivo para suministrar el antígeno adecuado para inmunización a la piel o epitelio y una composición con un portador. El portador incluye una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente seleccionados de – (gly)_{n1}–(arg)_{n2}, HIV-TAT y fragmentos de estos, y Antennapedia PTD, en donde el subíndice n1 es un entero que va de 0 a aproximadamente 20, y el subíndice n2 es independientemente un entero impar que va de cerca de 5 a aproximadamente 25. La asociación entre el portador y el antígeno no es covalente.

[0024] Aun otro objeto de esta invención es proporcionar un método para administrar un antígeno adecuado para inmunización para un sujeto. El método incluye aplicar tópicamente a la piel o epitelio del sujeto el antígeno adecuado para inmunización en conjunto con una cantidad efectiva de un portador. El portador contiene una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente. La asociación entre el portador y el antígeno no es covalente.

[0025] Esta composición también tiene una porción y/o agente objetivo y un portador. El portador incluye una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente y está presente en una cantidad efectiva para suministro transdérmico. La asociación entre el portador y la porción de formación de imágenes o agente objetivo no es covalente.

[0026] En un aspecto, la presente invención, suministra una composición que comprende un complejo no covalente de:

- a) estructura cargada positivamente; y
- b) al menos un miembro seleccionado de:
 - i) una primera estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de porciones formadores de imagen adjuntas, o una pluralidad de porciones formadores de imagen cargadas negativamente;
 - ii una segunda estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes objetivo adheridos, o una pluralidad de porciones objetivo cargadas negativamente;
 - iii) un agente biológicamente activo no nucleótido no proteína
 - iv) una proteína terapéutica diferente de insulina, toxinas botulinum, fragmentos de anticuerpo, o VEGF

en donde el complejo lleva la carga neta positiva.

[0027] los agentes biológicos, en este aspecto de la invención, pueden ser agentes terapéuticos o un agente cosmético. La invención excluye específicamente insulina, toxinas botulinum VEGA y fragmentos de anticuerpo en donde el término "terapéutico" o "proteína biológicamente activa" se emplea. En razón a que los antígenos adecuados para inmunización tienen otras actividades biológicas tales como montaje de una respuesta inmune, estas permanecen incluidas en los aspectos apropiados de esta invención sin embargo. Alternativamente, los agentes candidatos pueden utilizar para determinar la eficacia *in vivo* de estos complejos no covalentes.

[0028] En otro aspecto, la presente invención suministra una composición que comprende un complejo no covalente de una estructura cargada positivamente que tiene al menos un grupo de eficiencia unido y un agente para formación de imagen molecular, por ejemplo un agente de formación de imagen óptico. Más preferiblemente, en esta aplicación, el agente se objetivará a un agente particular para diagnóstico y/o efecto terapéutico. Por ejemplo, un agente de formación de imagen óptico se puede asociar con una estructura cargada positivamente y un componente para un melanoma objetivo para diagnóstico tópico objetivado de melanoma. En otro aspecto, la presente invención prevee un método para el suministro de un agente biológico a una superficie celular en un sujeto, dicho método comprende administrar a dicho sujeto una composición como se describió anteriormente.

[0029] En todavía otro aspecto, la presente invención suministra un método para preparar una composición farmacéutica o cosmética, el método comprende

combinar un componente de estructura cargado positivamente y al menos un miembro seleccionado de:

i) una primera estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de porciones formadoras de imagen adjuntas, o una pluralidad de porciones formadoras de imágenes cargadas negativamente;

ii) una segunda estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes objetivo adheridos, o una pluralidad de porciones objetivo cargadas negativamente;

iii) un agente biológicamente activo no nucleótido no proteína

iv) una proteína terapéutica diferente de insulina, toxinas botulinum, fragmentos de anticuerpo, o VEGF

con un portador farmacéuticamente o cosméticamente aceptable para formar un complejo no covalente que tiene una carga neta positiva.

[0030] En todavía otro aspecto, la presente invención suministra un kit para formular una composición de suministro farmacéutico o cosmético, el kit comprende un componente de estructura cargado positivamente y al menos un componente seleccionado de los grupos i) a iv) anteriores, junto con instrucciones para preparar la composición de administración.

[0031] En aún otro aspecto, esta invención se relaciona con una composición que comprende un agente biológicamente activo tal como proteína que tiene un peso molecular de menos de 20,000 kD y otros agentes biológicamente activos tales como, por ejemplo, agentes terapéuticos no nucleótidos no proteína tales compuesto ciertos antifúngicos o alternativamente un agente para inmunización, y un portador que comprende un portador cargado

positivamente que tiene una estructura con grupos de "eficiencia" o ramificados adheridos cargados positivamente, todos como se describieron aquí.

[0032] El agente biológicamente activo se puede basar en proteína (por ejemplo, una proteína que tiene un peso molecular de 20,000 kD), una proteína, agente terapéutico no nucleótido (por ejemplo, ciertos agentes antifúngicos), o un agente para inmunización. Agentes antifúngicos adecuados incluyen, por ejemplo, anfoterisina B, fluconazol, flucitosina, itraconazol, itraconazol, clotrimazol, heconozol, griceofulvina, miconazol, nistatina, o ciclopirux y similares. Como se emplea aquí, los agentes antigénicos adecuados para inmunización pueden ser antígenos basados en proteína que no alteran terapéuticamente los niveles de glucosa sanguínea, agentes no nucleótido no proteína o híbridos de estos. Así, los agentes incluidos son antígenos de ellos mismos adecuados para inmunización. Antígenos adecuados incluyen, por ejemplo, aquellos para agentes ambientales, patógenos o biorriesgosos. Otros ejemplos de antígenos adecuados incluyen aquellos que se pueden utilizar para inmunización contra malaria, rabia, ántrax, tuberculosis o aquellas inmunizaciones relacionadas con niños tales como hepatitis B, difteria, pertusis, tétano, hemofilia influenza tipo B, poliovirus inactivado, paperas, sarampión, rubéola, varicela, neumococo, hepatitis A e influenza.

[0033] Más preferiblemente, el portador cargado positivamente es un polipéptido de cadena larga cargado positivamente o un polímero no peptídico cargado positivamente, por ejemplo, una polialquilenoimina. Proteínas y terapéuticos no nucleótido no proteína que no son normalmente capaces de cruzar la piel o el epitelio apreciablemente [relacionado con el complejo del mismo agente y los portadores de la presente invención] y que no tiene un efecto terapéutico en

la reducción en la glucosa sanguínea tienen propiedades fisicoquímicas y de superficie ampliamente diferentes que normalmente podrían hacerla incierta si una técnica que produce suministro transdérmico de, por ejemplo, insulina, se aplicara a la proteína y los terapéuticos no proteína. Sin embargo, portadores de esta invención que tienen una estructura cargada positivamente con grupos ramificados cargados positivamente, como se describe aquí, son bastante sorprendentemente capaces de proveer suministro transdérmico de terapéuticos de proteína y no proteína.

[0034] Portadores particulares adecuados para el suministro transdérmico de proteínas particulares puede fácilmente ser identificado utilizando ensayos tales como aquellos descritos en los ejemplos. Tal como una proteína puede, por ejemplo ser una proteína pequeña que tiene un peso molecular de menos de 20,000 kD. Como se utiliza aquí, la palabra "terapéutico" en el contexto de la glucosa sanguínea se refiere a niveles de glucosa sanguínea suficientes para aliviar los síntomas agudos de signos de hiperglicemia, por ejemplo en pacientes diabéticos.

[0035] Esta invención también suministra un método para preparar una composición farmacéutica o cosmética que comprende combinar un portador que comprende un polímero no peptídico cargado positivamente o polipéptido cargado positivamente tal como una polialquilenimina de cadena larga (en donde el polipéptido o polímero no peptídico tiene ramificaciones cargadas positivamente o grupos de "eficiencia" como se define aquí) con un agente biológicamente activo tal como, por ejemplo, proteína que tiene un peso molecular de menos de 20,000 kD. Alternativamente, el portador se puede combinar con otros agentes biológicamente activo tales como, por ejemplo, un agente terapéutico no

nucleótido no proteína (por ejemplo, ciertos antifúngicos) o alternativamente un agente para inmunización.

[0036] La presente invención también suministra un kit para la preparación o formulación de una composición que comprende un portador y una sustancia terapéutica, así como también Items adicionales que son necesarios para producir una formulación adecuada, o una premezcla que puede en cambio ser utilizada para producir tal una formulación. Tal un kit puede consistir de un aplicador u otro dispositivo para aplicaciones de las composiciones o componentes de esta de acuerdo con los métodos de la presente invención. Como se utiliza aquí, "dispositivos" se puede referir, por ejemplo, a un instrumento o aplicador adecuado para suministrar, mezclar o preparar de otra forma las composiciones de acuerdo con los métodos de la presente invención.

[0037] Esta invención también suministra dispositivos para la transmisión transdérmica de una agente biológicamente activo que está contenido dentro de una composición que incluye un portador que comprende un polipéptido cargado positivamente de preferiblemente longitud de cadena corta a cadena intermedia u otro portador polimérico no peptídico de cadena larga que tiene grupos ramificados cargados positivamente o grupos "de eficiencia" como se define aquí. Tales dispositivos pueden ser tan simples en construcción como un parche de piel, o pueden ser dispositivos más complicados que pueden incluir medios para dispensar o monitorear el suministro de la composición, y opcionalmente medios para monitorear la condición del sujeto en uno o más aspectos, que incluyen monitorear la reacción del sujeto a las sustancias que se dispensan.

[0038] En otro aspecto de la invención, el dispositivo puede contener solo un agente biológicamente activo terapéutico y un portador que se puede aplicar separadamente a la piel. De acuerdo con esto, la invención también comprende un kit que incluye un dispositivo para dispensar vía de la piel y un material que contiene un portador cargado positivamente o estructura, que es adecuado para adecuar a la piel o epitelio de un sujeto.

[0039] En general, la invención también comprende un método para administrar un agente biológicamente activo que incluye administrar tópicamente una cantidad efectiva del agente biológicamente activo en conjunto con un polipéptido cargado positivamente o polímero no polipeptídico tal como una polialquilenimina que tiene grupos ramificados cargados positivamente, como se describe aquí.

[0040] Por "en conjunto con" significa que los dos componentes se administran en un procedimiento de combinación, que puede involucrar combinarlos en una composición, que luego se administra al sujeto, o se administran separadamente, pero en una forma tal que ellos actúan juntos para proveer el requisito de administración de una cantidad efectiva del agente biológicamente activo. Por ejemplo, una composición que contiene el portador cargado positivamente puede primero ser aplicado a la piel del sujeto, seguido por aplicar un parche de piel u otro dispositivo que contiene el agente biológicamente activo.

[0041] La invención también se relaciona con métodos para aplicar un agente biológicamente activo a células epiteliales, que incluyen aquellas diferentes

de células epiteliales de la piel, por ejemplo, células epiteliales oftálmicas o células del sistema gastrointestinal.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0042] La Figura 1 suministra una representación esquemática de los componentes utilizados en la invención.

[0043] La Figura 2 suministra una representación esquemática de varias modalidades de la invención.

[0044] Las Figuras 3-4 representa los resultados del suministro transdérmico de un plásmido que contiene el transgen para E-coli beta-galactosidasa como se describe en el ejemplo 2.

[0045] La Figura 5 representa los resultados del suministro transdérmico de un plásmido que contiene el trasngen para E-coli beta-galactosidasa como se describe en el ejemplo 3.

[0046] La Figura 6 representa los resultados del suministro transdérmico de un plásmido que contiene el trasngen para E-coli beta-galactosidasa como se describe en el ejemplo 4.

[0047] La Figura 7 representa los resultados del suministro transdérmico de un plásmido que contiene el trasngen para E-coli beta-galactosidasa como se describe en el ejemplo 5.

[0048] La Figura 8 es una representación fotográfica de los resultados del suministro transdérmico de la toxina botulinum como se describe en el ejemplo 6.

[0049] La Figura 9 es una representación fotográfica que los complejos de formación de imagen del ejemplo 9 siguen la distribución de campo claro (paneles A y C) para células pigmentadas con melanoma con agentes formadores de imagen ópticos fluorescentes. (paneles b y d) para dos campos diferentes y magnificaciones diferentes (paneles a y b a 10X versus paneles c y d a magnificaciones 40X).

[0050] La Figura 10 es una representación fotográfica que muestra el tñido positivo por NeutrAvidin como se describe en el ejemplo 10 en dos magnificaciones diferentes. Las partes (a) y (b) de la Figura 10a son magnificaciones 10X y las partes (c) y (d) son magnificaciones 20X. Las partes (e) y (f) de la Figura 10 (b) están en magnificación 20X para tñido repetido.

[0051] La Figura 11 representa los resultados para toxicidad relativa para estructuras de portador como se describe en el ejemplo 11.

[0052] La Figura 12 representa los resultados de la eficiencia de suministro de gen transdérmico como se describe en el ejemplo 11.

[0053] La Figura 13 es una representación fotográfica de suministro selectivo de la sonda formadora de imagen óptica para células CEA-positivas que muestran una imagen de campo claro de carcinoma de colon y co cultivo de fibroblastos (panel a) y fluorescencia de imagen de carcinoma de colon (panel b) como se describe en el ejemplo 11.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0054] La presente invención suministra un sistema basado en componentes par suministro selectivo, persistente de agentes formadores de imagen u otros agentes terapéuticos. Las características individuales para las composiciones se pueden seleccionar al designar componentes deseados en formulaciones de cabecera. Adicionalmente, en un aspecto, la formación de imágenes y las porciones objetivo específicas se suministran para formar un complejo no covalente (preferiblemente iónico) con una estructura positiva. Al colocar estos componentes no covalentemente en el complejo, la invención obvia la necesidad de adherir componentes en ubicaciones precisas sobre una estructura positiva, en contraste a otras estrategias que incrementan la complejidad y costo y reducen la eficiencia a un nivel que ninguna combinación exitosa se ha reportado aún debido a limitaciones estéricas. En otro aspecto de la invención, ciertas sustancias se pueden suministrar transdérmicamente por uso de ciertos portadores cargados positivamente solos, sin requerir la inclusión de una estructura negativa. En estos casos, la sustancia o un derivado de esta tiene suficientes funcionalidades para asociar con los portadores de la presente invención no covalentemente, preferiblemente iónicamente. El término "suficientes" en este contexto se refiere a una asociación que se puede determinar, por ejemplo, al cambiar el tamaño de partícula o espectrofotometría funcional versus los componentes solos.

[0055] El entendimiento adicional de la invención se da comprensión adicional de la invención con referencia a la Figura 1. En esta Figura, los componentes se muestran como (1) una estructura sólida que tiene grupos adheridos cargados positivamente (también referidos como grupos de eficiencia

mostrados en círculos oscuros unidos a una barra oscura), por ejemplo $(\text{Gly})_{n1}$ - $(\text{Arg})_{n2}$ (en donde el subíndice $n1$ es un entero que va de 3 a aproximadamente 5, y el subíndice $n2$ es un entero impar que va de cerca de 7 a aproximadamente 17) o dominios TAT; (2) porciones formadoras de imágenes (triángulos abiertos unidos a una barra clara); (3) agentes objetivos y/o (4) agentes biológicamente activos (círculos abiertos unidos a una barra clara) tales como agentes terapéuticos no nucleótidos no proteína o terapéuticos basados en proteína diferentes de insulina, toxinas botulinum, DEGF y fragmentos de anticuerpo; la Figura 2 ilustra varios ejemplos de composiciones multicomponente en donde los grupos se describen como se establece en la Figura 1. Por ejemplo, en la Figura 2, una primer composición multicomponente se ilustra en la que una estructura cargada positivamente tiene asociada un componente de formación de imágenes, un componente objetivo, un terapéutico. Una segunda composición multicomponente se ilustra la cual se designa para formación de imágenes diagnóstica/pronóstico. En esta composición la estructura cargada positivamente es compleja con los componentes de formación de imagen ópticos y los componentes objetivos por ejemplo reconocer melanoma para crear una plataforma de detección de melanoma tópico. La presente invención, descrita más completamente adelante, suministra un número de composiciones adicionales útiles en programas terapéuticos y de diagnóstico.

Composiciones:

[0056] El término "agente biológicamente activo" como se utiliza aquí se refiere a un agente terapéutico que cura una enfermedad o alivia un problema relacionado con la salud (que incluye problemas relacionados con la salud que son evaluados subjetivamente y/o cosméticos). Por ejemplo, el agente biológicamente

activo puede ser una proteína terapéutica, y en ciertas modalidades, es preferible una proteína con un peso molecular de menos de 20,000 kD. Note, sin embargo, que la invención excluye específicamente insulina, toxinas botulinum, VEGF y fragmentos de anticuerpo cuando el término se emplea el término "terapéutico" o "proteína biológicamente activo". En razón a que los antígenos adecuados para la inmunización tienen otras actividades biológicas tales como montaje de una respuesta inmune, estas permanecen incluidas en los aspectos apropiados de esta invención, sin embargo. En otras modalidades de la invención, el agente biológicamente activo puede ser un agente no nucleótido no proteína, (por ejemplo, ciertos agentes antifúngicos). Otros ejemplos no limitantes de agentes biológicamente activos adecuados se suministran como se discute aquí.

[0057] En todos los aspectos de la presente invención, la asociación entre portadores como se describe aquí y el agente biológicamente activo es mediante interacción no covalente, que pueda incluir, por ejemplo, interacciones iónicas, unido por hidrógeno, fuerzas vander Waals, o combinaciones de estos.

[0058] En ciertas modalidades, la presente invención suministra una composición que comprende un complejo no covalente de:

a) una estructura cargada positivamente; y

b) al menos un número seleccionado de:

i) una primera estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de porciones formadoras de imagen adheridas, o una pluralidad de porciones formadoras de imagen cargadas negativamente;

- ii) una segunda estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes objetivo adheridos, o una pluralidad de porciones objetivo cargadas negativamente;
- iii) un agente biológicamente activo no nucleótido no proteína
- iv) una proteína terapéutica diferente de insulina, toxinas botulinum, VEGF y fragmentos de anticuerpo.

En donde el complejo lleva una carga positiva neta. En un grupo de modalidades, la composición comprende al menos dos miembros seleccionado de los grupos i) a iv). En otro grupo de modalidades, la composición comprende al menos un miembro de cada uno de los grupos i) y ii), y uno seleccionado de iii) o iv).preferiblemente, la estructura cargada positivamente tiene una longitud de cerca de 1 a 4 veces las longitudes combinadas de los miembros del grupo b). Alternativamente, la estructura cargada positivamente tiene una proporción de carga de cerca de 1 a 4 veces la carga combinada de los miembros del grupo b). En algunas modalidades, la densidad en la carga es uniforme y la longitud y proporción de carga es aproximadamente la misma. Se pueden determinar las proporciones tamaño a tamaño (longitud) basado en estudios moleculares de los componentes o se puede determinar a partir de las masas de los componentes.

[0059] Por "cargado positivamente", significa que el portador tiene una carga positiva por debajo de al menos algunas condiciones de fase de solución, más preferiblemente al menos bajo algunas condiciones fisiológicamente compatibles. Más específicamente "cargado positivamente" como se utiliza aquí, significa que el grupo en cuestión contiene funcionalidades que se cargan bajo todas las condiciones de pH, tales como una amina cuaternaria, o que contienen una funcionalidad que puede adquirir carga positiva bajo ciertas condiciones de

fase de solución, tal como cambios de pH en el caso de aminas primarias. Más preferiblemente "cargado positivamente" como se utiliza aquí se refiere a aquellas funcionalidades que tienen el comportamiento de asociarse con aniones sobre condiciones fisiológicamente compatibles. Los polímeros con una multiplicidad de porciones cargadas positivamente no necesitan ser homopolímeros, así como será evidente para un experto en la técnica. Otros ejemplos de porciones cargadas positivamente son bien conocidos en la técnica anterior y se pueden emplear fácilmente, como será evidente para aquellos expertos en la técnica. Los portadores cargados positivamente descritos en esta invención que ellos mismos no tienen una actividad terapéutica representan compuestos novedosos que tienen utilidad, por ejemplo, en composiciones y métodos como se describe aquí. Así, el otro aspecto de la presente invención, detallamos estos compuestos novedosos que incluyen cualquier portador que comprenda una estructura cargada positivamente que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente como se describe aquí y que en sí mismo no tienen una actividad biológica terapéutica. La invención excluye específicamente fragmentos de anticuerpos cuando se emplea el término "terapéutico" o "proteína biológicamente activo". En razón a que los antígenos adecuados para inmunización tienen otras actividades biológicas tales como montar una respuesta inmune, estas permanecen incluidas en los aspectos apropiados de esta invención, sin embargo.

[0060] En otra modalidad, la presente invención suministra una composición que comprende un agente biológicamente activo y un portador que comprende una estructura cargada positivamente. El agente biológicamente activo puede ser, por ejemplo, una proteína (particularmente aquellas que tienen un peso molecular de menos de 20,000 kD), un agente terapéutico no nucleótido no proteína (tal como ciertos antifúngicos) o un agente para inmunización. El portador puede ser,

por ejemplo, un polipéptido cargado positivamente o polímero no peptídico, que puede ser un hetero- u homopolímero tal como una polialquilenimina. El polipéptido o polímero no peptídico puede tener grupos de "eficiencia" o grupos ramificados cargados positivamente como se define aquí. Cada terapéutico no proteína no nucleótido y terapéutico basado en proteína tiene distintas propiedades fisicoquímicas que alteran las características del complejo total. Tales portadores cargados positivamente están entre los materiales descritos adelante como estructuras cargadas positivamente.

[0061] La invención también provee un método para administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente biológicamente activo que comprende aplicar a la piel o epitelio del sujeto (que puede ser un humano u otro mamífero) el agente biológicamente activo y la cantidad de estructura cargada positivamente que tiene grupos ramificados que son efectivos para proveer suministro transdérmico de la proteína al sujeto. En este método, la proteína y el portador cargado positivamente se pueden aplicar como una composición premezclada, o se pueden aplicar de forma separada a la piel o epitelio. Por ejemplo, la proteína, puede ser un parche para la piel u otro dispositivo y el portador se puede contener en un líquido u otro tipo de combinación que se aplica a la piel antes de la aplicación del parche para la piel.

Estructura cargada positivamente

[0062] La estructura cargada positivamente (también referida como un "portador" cargado positivamente) es típicamente una cadena lineal de átomos, con grupos en la cadena que llevan una carga positiva en pH fisiológico, o con grupos que llevan una carga positiva adherida a las cadenas laterales que se

extienden desde la estructura. Preferiblemente, la estructura cargada positivamente en sí misma no tendrá una actividad biológica terapéutica o enzimática definida. La estructura lineal es una estructura de hidrocarburo que es, en algunas modalidades, interrumpido por heteroátomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno, azufre, silicio y fósforo. La mayoría de átomos de cadena de estructura son usualmente carbono. Adicionalmente, la estructura tendrá a menudo un polímero de unidades de repetición (por ejemplo, aminoácidos, poli (etileneoxi), poli (propilenoamina), polialquilenoimina, y similares) pero puede ser un heteropolímero. En un grupo de modalidades, la estructura cargada positivamente es una polipropilenoamina en donde un número de átomos de nitrógeno amina están presente como grupos amonio (tetra sustituidos) que llevan una carga positiva. En otra modalidad, la estructura cargada positivamente es un polímero no peptídico, que puede ser un heter-homo polímero tal como una polialquilenoimina, por ejemplo, una polietilenoimina o polipropilenoimina, que tienen un peso molecular que va de cerca de 10,000 a aproximadamente 2,500,000, preferiblemente cerca de 100,000 a aproximadamente 1,800,000, y más preferiblemente de cerca de 500,000 a aproximadamente 1,400,000. En otro grupo de modalidades, la estructura tiene unida una pluralidad de porciones de cadena lateral que incluyen grupos cargados positivamente (por ejemplo, grupos amonio, grupos piridinio, grupos fosfónio, grupos sulfonio, grupos guanidino, o grupos amidino). Las porciones de cadena lateral en este grupo de modalidades se pueden colocar en espacios a lo largo de la estructura que son consistentes en separaciones o variables. Adicionalmente, la longitud de las cadenas laterales puede ser similar o diferente. Por ejemplo, en un grupo de modalidades, las cadenas laterales pueden ser cadenas de hidrocarburo lineal o ramificado que tienen de 1 a 20 átomos de carbono y que terminan en el extremo distal (lejos de la estructura) en uno de los grupos cargados positivamente mencionados

anteriormente. En todos los aspectos de la presente invención, la asociación entre el portador y el agente biológicamente activo es mediante interacción no covalente, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen interacciones iónicas, unido a hidrógeno, fuerzas van der Waals, o combinaciones de estos.

[0063] En un grupo de modalidades, la estructura cargada positivamente es un polipéptido que tiene múltiples grupos de cadena lateral cargados positivamente (por ejemplo, lisina, arginina, ornitina, homoarginina, y similares). Preferiblemente, el polipéptido tiene un peso molecular que va de cerca de 10,000 a aproximadamente 1,500,000, más preferiblemente de cerca de 25,000 a aproximadamente 1,200,000, más preferiblemente de cerca de 100,000 a aproximadamente 1,000,000. Un experto en la técnica apreciará que cuando los aminoácidos se utilizan en esta porción de la invención, las cadenas laterales pueden tener la forma D o L (configuración R o S) en el centro de la unión. Alternativamente, la estructura puede ser un análogo de un polipéptido tal como un peptoide. Ver, por ejemplo, Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32:543 (1993); Zuckerman *et al. Chemtracts – Macromol. Chem.* 4:80 (1992); y Simon *et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:9367 (1992)). En resumen, un peptoide es una poliglicina en la que la cadena lateral está adherida a los átomos de nitrógeno de la estructura a los átomos α -carbono. Como se hizo anteriormente, una porción de las cadenas laterales terminará típicamente en un grupo cargado positivamente para suministrar un componente de estructura cargado positivamente. La síntesis de peptoides se describe en, por ejemplo, la patente Estadounidense No. 5,877,278. Como se utiliza aquí el termino, estructura cargada positivamente que tiene una construcción de estructura peptoide se considera "no péptido" ya que ellas no están compuestas de aminoácidos que tienen cadenas laterales de ocurrencia natural en las ubicaciones α -carbono.

[0064] Una variedad de otras estructuras se puede utilizar empleando, por ejemplo, mímicos estéricos o electrónicos de polipéptidos en donde los enlaces amida del péptido se reemplazan con subrogados tales como enlaces éster, tioamidas (-CSNH-), tioamida reversa (-NHCS-), aminometileno (-NHCH₂-) o los grupos metileneamina reversa (-CH₂NH-) , grupos de keto- metileno (-COCH₂-) , fosfinate (-PO₂RCH₂-), fosfonamidato y fosfonamidato éster (-PO₂RNH-), péptido reverso (-NHCO-), trans-alqueno (-CR=CH-), fluoroalqueno (-CF=CH-), dimetileno (-CH₂CH₂-), tioeter (-CH₂S-), hidroxietileno (-CH(OH)CH₂-), metileneoxi (-CH₂O-), tetrazol (CN₄), sulfonamida (-SO₂NH-), metilenesulfonamida (-CHRSO₂NH-), sulfonamida reversa (-NHSO₂-), y estructuras con subunidades de malonato y/o gem-diamino-alquilo, por ejemplo, como se revisó por Fletcher et al. ((1998) Chem. Rev. 98:763) y detallado por las referencias citadas allí. Muchas de las anteriores sustituciones resultan en estructuras de polímero isostédico relacionadas con estructuras formadas de α -aminoácidos.

[0065] En cada una de las estructuras suministradas anteriormente, se pueden anexar grupos de cadena lateral que llevan un grupo cargado positivamente. Por ejemplo, estructuras ligadas con sulfonamida (-SO₂NH- y -NHSO₂-) pueden tener grupos de cadena lateral adheridos a los átomos de nitrógeno. De forma similar, el enlace de hidroxietileno (-CH(OH)CH₂-) puede llevar un grupo de cadena lateral adherido al sustituyente hidroxilo. Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente las otras químicas de enlace para suministrar grupos de cadena lateral cargados positivamente que utilizan métodos sintéticos estándar.

[0066] En una modalidad particularmente preferida, la estructura cargada positivamente es un polipéptido que tiene grupos ramificados (también referidos como grupos de eficiencia) que comprenden $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT o fragmentos de estos, u otro dominio de transducción de proteína de Antennapedia, o fragmento de estos, en el que el subíndice $n1$ es un entero que va de 0 a 20, más preferiblemente 0 a 8, aún más preferiblemente 2 a 5, y el subíndice $n2$ es independientemente un entero impar que va de cerca de 5 a aproximadamente 25, más preferiblemente de cerca de 7 a aproximadamente 17, más preferiblemente de cerca de 7 a aproximadamente 13. Todavía modalidades preferidas adicionales son aquellas modalidades en las que el fragmento HIV-TAT tiene la fórmula $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$ o $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$ en donde los subíndices p y q cada uno son independientemente un entero que va de 0 a 20 y el fragmento se adhiere a la estructura por vía del C- terminal o el N- terminal del fragmento. Los fragmentos HIV-TAT preferidos son aquellos en los cuales los sucritos p y q cada uno son enteros independientemente que van de 0 a 8, más preferiblemente 2 a 5. En otra modalidad preferida de la cadena lateral cargada positivamente o grupo ramificado es el dominio de transducción de proteína Antennapedia (ANTP), o un fragmento de esta que retiene actividad. Preferiblemente, el portador cargado positivamente incluye grupos ramificados de cadena lateral cargados positivamente en una cantidad de al menos aproximadamente 0.05%, como un porcentaje del peso total del portador, preferiblemente va de cerca de 0.05 a aproximadamente 45% en peso, y más preferiblemente va de cerca de 0.1 a aproximadamente 30% en peso. Para grupos ramificados cargados positivamente que tienen la fórmula $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, la cantidad más preferida va de 0.1 a aproximadamente 25%.

[0067] En otra modalidad particularmente preferida, la porción de estructura es un grupo ramificado cargado positivamente y polilisina que se unen a los grupos aminolisina de cadena lateral. La polilisina utilizada en esta modalidad particularmente preferida tiene un peso molecular que va de cerca de 10,000 a aproximadamente 1,500,000, preferiblemente va de cerca de 25,000 a aproximadamente 1,200,000, y más preferiblemente va de cerca de 100,000 a aproximadamente 1,000,000. Esta puede ser cualquiera de las polilisinas disponibles comercialmente (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA) tales como, por ejemplo, polilisina que tiene > 70,000, polilisina que tiene PM de 70,000 a 150,000, polilisina que tiene PM 150,000 a 300,000 y polilisina que tiene PM > 300,000. La selección de una polilisina apropiada dependerá de los componentes restantes de la composición y será suficiente suministrar una carga positiva neta general para la composición y suministra una longitud que es preferiblemente de 1 a 4 veces la longitud combinada de los componentes cargados negativamente. Los grupos ramificados cargados positivamente preferidos o grupos de eficiencia incluyen, por ejemplo, -gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg (-Gly₃ATg₇) o HIV-TAT. En otra modalidad preferida de la estructura cargada positivamente es una polialquilenimina de cadena larga tal como polietilenoimina, por ejemplo, una que tiene un peso molecular de aproximadamente 1,000,000.

[0068] Las estructuras cargadas positivamente o moléculas portador que comprenden polipéptidos o polialquileniminias que tienen grupos ramificados descritos anteriormente, son compuestos novedosos y forman un aspecto de esta invención.

[0069] En una modalidad de la invención, solo un portador cargado positivamente que tiene grupos ramificados cargados positivamente es necesario para suministro transdérmico de la sustancia activa (por ejemplo, un agente biológicamente activo, o agente formador de imagen/objetivo). En una modalidad de este caso el portador cargado positivamente es un polipéptido (por ejemplo, lisina, arginina, ornitina, homoarginina, y similares) que tiene múltiples grupos de cadena lateral cargados positivamente, como se describió anteriormente. Preferiblemente, el polipéptido tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 10,000,000. En otra modalidad, el portador cargado positivamente es un polímero no peptídico tal como una polialquilenoimina que tiene grupos de cadena lateral cargados positivamente que tienen un peso molecular de al menos cerca de 100,000. Tales polialquilenoiminas incluyen polietileno y polipropilenoiminas. En cualquier caso, para uso como el único agente necesario para el suministro transdérmico las moléculas portadoras cargadas positivamente incluyen grupos de eficiencia o grupos ramificados cargados positivamente, que comprenden $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, en el que el subíndice $n1$ es un entero que va de 0 a 20 más preferiblemente de 0 a 8, todavía más preferiblemente 2 a 5, y el subíndice $n2$ es independientemente un entero impar que va de 5 a aproximadamente 25, más preferiblemente va de 7 a aproximadamente 17, y más preferiblemente va de 7 a aproximadamente 13, HIV.TAT o fragmentos de estos, o Antennapedia (PTD) o un fragmento de esta. Preferiblemente los grupos ramificados o de cadena lateral tienen la fórmula general $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ como se describió anteriormente. Otras modalidades preferidas son aquellas en las que los grupos ramificados o grupos de eficiencia son fragmentos HIV-TAT que tienen la fórmula $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$, o $(\text{gly})_p\text{-RKXRRQRRR-(gly)}_q$, en donde el subíndice p y q cada uno son independientemente un entero que va de 0 a 20 y el fragmento

se une a la molécula portadora por vía del C- terminal o el N-terminal del fragmento. Los grupos ramificados laterales pueden tener cualquier forma de D o L (configuración R o S) en el centro de la unión. Los fragmentos HIV-TAT preferidos son aquellos en los que los subíndices p y q son cada uno independientemente enteros que van de 0 a 8, más preferiblemente 2 a 5. Otras modalidades preferidas son aquellas en las que los grupos ramificados son grupos Antennapedia (PTD) o fragmentos de estos que retienen la actividad del grupo. Estos son conocidos en la técnica, por ejemplo, de Console et al., J. Biol. Chem. 278:35109 (2003).

[0070] En una modalidad particularmente preferida, el portador es una polilisina con grupos ramificados cargados positivamente adheridos a los grupos amino de cadena lateral. La polilisina utilizada en esta modalidad particularmente preferida puede ser cualquiera de las polilisinas disponibles comercialmente (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA, por ejemplo) tales como, por ejemplo, polilisina que tiene MW > 70,000, polilisina que tiene PM de 70,000 a 150,000, polilisina que tiene PM 150,000 a 300,000 y polilisina que tiene PM > 300,000. Sin embargo, preferiblemente la polilisina tiene un PM de al menos aproximadamente 10,000. Grupos ramificados cargados positivamente preferidos o grupos de eficiencia incluyen, por ejemplo, -gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg- arg-arg-arg (-Gly₃ATg₇), HIV-TAT o fragmentos de esto, y Antennapedia (PTD) o fragmentos de esto.

Otros componentes

[0071] En adición al componente de estructura cargado positivamente, las composiciones multicomponentes de la presente invención comprenden al menos un componente de lo siguiente:

- i) una primera estructura cargada negativamente que tiene un pluralidad de porciones formadoras de imagen adheridas, o una pluralidad de porciones formadoras de imagen cargadas negativamente;
- ii) una segunda estructura cargada negativamente que tiene un pluralidad de porciones formadoras de porciones objetivo adheridas, o una pluralidad de porciones objetivos cargadas negativamente;
- iii) un agente biológicamente activo no nucleótido no proteína
- iv) una proteína terapéutica diferente de insulina, toxinas botulinum, VEGF, y fragmentos de anticuerpo.

[0072] En un aspecto relacionado, como se describe aquí, en algunas de las modalidades o composiciones de la invención, la estructura cargada positivamente o portador se puede utilizar solo para proveer suministro transdérmico de ciertos tipos de sustancias. Combinaciones de agentes biológicamente activos como se describe aquí tales como, por ejemplo, combinaciones de terapéuticos no proteína no nucleótido tales como agentes fúngicos o proteínas diferentes de insulina, toxinas botulinum, VEGF y fragmentos de anticuerpo (particularmente aquellos que tienen un peso molecular menor de 20,000 kD) y agentes antigénicos adecuados para inmunización también se pueden emplear en estas composiciones. En un aspecto relacionado con la invención, algunas modalidades o composiciones incluirán un agente formador de imagen tal como un agente adecuado para formación de imágenes por resonancia magnética u otro formador de imagen óptico. Estas modalidades o composiciones

pueden, por ejemplo, producir suministro tópico de un agente formador de imagen óptico para melanoma.

[0073] Las estructuras cargadas negativamente, cuando se utilizan para llevar las porciones formadores de imagen, porciones objetivo y agentes terapéuticos, puede ser una variedad de estructuras (similar a aquellas descritas anteriormente) que tienen múltiples grupos que llevan una carga negativa en el pH fisiológico. Alternativamente, las porciones formadoras de imagen, porciones objetivos y agentes terapéuticos con porciones cargadas negativamente con suficiente superficie no requerirán la unión de una estructura adicional para complejación iónica con las estructuras cargadas positivamente como será fácilmente evidente para un experto en la técnica. "suficiente" en este complejo implica que una densidad adecuada de grupos cargados negativamente está presente sobre la superficie de las porciones formadoras de imagen, porciones objetivo o agentes terapéuticos para producir una atracción iónica con estructuras cargadas positivamente descritas anteriormente. En estos casos, la sustancia o un derivado de esta tiene suficiente carga negativa para asociar con portadores cargados positivamente de la presente invención no covalentemente. Alternativamente, otras porciones no cargadas se pueden emplear para una densidad suficiente para producir asociación no covalente no iónica con las estructuras portadoras de la presente invención, como será evidente para una persona experta en la técnica. El término "suficiente" en el contexto de las interacciones no covalente no iónicas se puede determinar por ejemplo mediante un cambio en el tamaño de partícula o espectrometría funcional versus los componentes solos. Grupos cargados negativamente adecuados son ácidos carboxílicos, fosfínicos, fosfónicos o fosfóricos, ácidos sulfinico o sulfónico, y similares. En otras modalidades, la estructura cargada negativamente es un

oligosacárido (por ejemplo, dextran). En todavía otras modalidades, la estructura cargada negativamente es un polipéptido (por ejemplo, ácido poliglutámico, ácido poliaspártico o un polipéptido en el que los residuos de ácido glutámico o ácido aspártico se interrumpen por aminoácidos no cargados). Las porciones descritas en más detalle adelante (porciones formadoras de imagen, agentes objetivo, y agentes terapéuticos) se pueden adherir a una estructura que tiene estos grupos pendientes, típicamente por vía de enlaces éster. Alternativamente, los aminoácidos que interrumpen los aminoácidos cargados negativamente o se anexan al terminal de la estructura cargada negativamente, se pueden utilizar para unir porciones formadores de imágenes y porciones objetivo por vía, por ejemplo, de enlaces de bisulfuro (a través de un residuo de cisteína), enlaces amida, enlaces éter (a través de grupos serina o hidroxilo treonina) y similares.

[0074] Las porciones formadoras de imagen y las porciones objetivo pueden ellas mismas ser aniones pequeños en ausencia de un polímero cargado negativamente. Las porciones formadora de imágenes, porciones objetivo y agentes terapéuticos también pueden ser ellos mismos modificados covalentemente para producir porciones cargadas negativamente de superficie suficiente para complejación iónica con las estructuras cargadas positivamente como será fácilmente evidente para un experto en la técnica. En ambos de estos casos, la sustancia o derivado de esta tiene suficiente carga negativa para asociarse con los portadores cargados positivamente de la siguiente invención no covalentemente. El término "suficiente" en este contexto se refiere a una asociación que se puede determinar por ejemplo, al cambiar el tamaño de partícula o espectrofotometría funcional versus los componentes.

Porciones formadoras de imagen

[0075] Una variedad de porciones formadoras de imagen o de diagnóstico son útiles en la presente invención y están presentes en una cantidad efectiva que dependerá de la condición a ser diagnosticada o representada con imágenes, la ruta de administración, la sensibilidad de la gente, dispositivo utilizado para detección del agente, y similares.

[0076] Ejemplos de agentes de diagnóstico o formadores de imagen adecuados incluyen agentes de contraste radio opaco, agentes de contraste paramagnético, agentes de contraste superparamagnético, porciones formadores de imagen óptica, agentes de contraste CT y otros agentes de contraste. Por ejemplo, los agentes de contraste radiopaco (para formación de imagen de rayos x) incluirán compuestos de yodo orgánico e inorgánico (por ejemplo diatrizoato), metales radiopacos y sus sales (por ejemplo, plata, oro, platino y similares) y otros compuestos radiopacos (por ejemplo, sales de calcio, sales de bario tales como sulfato de bario, tántalo y óxido de tántalo). Agentes de contraste para magnético adecuados (para formación de imágenes MR) incluyen ácido gadolinio dietileno triamino pentacético (Gd-DTPA) y sus derivados, y otros complejos de gadolinio, manganeso, hierro, disprosio, cobre, europio, erbio, cromo, níquel y cobalto, que incluyen complejos con ácido 1, 4, 7, 10-tetraazaciclododecano- N,N',N'',N'''- ácido tetraacético (DOTA), ácido etilenediaminetetraacético (EDTA), 1,4,7,10-tetraazaciclododecano -N,N',N''- ácido triacético (DO3A), 1,4,7-triazaciclononano- N,N',N''- ácido triacético (NOTA), 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-N,N',N'',N'''- ácido tetraacético (TETA), hidroxibenziletileno-diamina diacético ácido (HBED) y similares. Agentes de contraste superparamagnético adecuados (para formación de imágenes MR) incluyen magnetitas, óxido de hierro superparamagnético, óxidos

de hierro supercristalito, particularmente formas complejas de cada uno de estos agentes que se puede adherir a la estructura cargada negativamente. Todavía otros agentes formadores de imágenes son los agentes de contraste CT que incluyen agentes de contrastes CT no iónico y iónico y yodinado y no yodinado, así como también agentes de contraste tales como etiquetas spin u otros agentes diagnósticamente efectivos. Los agentes formadores de imagen óptico adecuado se incluyen, por ejemplo, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, verde Oregon 488, verde Oregon 500, verde Oregon 514, proteína fluorescente verde, 6-FAM, Texas Rojo, Hex, TET, y HAMRA.

[0077] Otros ejemplos de agentes de diagnóstico incluyen marcadores. Una amplia variedad de marcadores o etiquetas se puede emplear, tal como radionuclidos, fluoros, enzimas, sustratos de enzima, cofactores de enzimas, inhibidores de enzimas, ligandos (particularmente haptenos), y similares. Todavía otra sustancias útiles son aquellas etiquetadas con componentes especies radioactivos, tales como ^{99m}Tc glucoceptonato.

[0078] La elección de adherir una porción formadora de imagen a una estructura cargada negativamente dependerá de una variedad de condiciones. Ciertos agentes formadores de imagen son neutrales en pH fisiológico y se unirán preferiblemente a una estructura cargada negativamente o modificada covalentemente para incluir porciones cargadas negativamente suficientes para formar un complejo con el portador cargado positivamente. Otros agentes formadores de imagen llevan suficiente carga negativa para formar un complejo con el portador cargado positivamente, aún en la ausencia de la estructura cargada negativamente. En estos casos, la sustancia o un derivado de esta tiene suficiente carga negativa para asociarse con los portadores cargados

positivamente de la presente invención no covalentemente. El término "suficiente" en este contexto se refiere a una asociación que se puede determinar, por ejemplo, por el cambio en el tamaño de partícula o espectrofotometría funcional versus los componentes solos. Un ejemplo de una porción formadora de imagen cargada negativamente es de ión de fosfato que es útil para la formación de imágenes por resonancia magnética.

Agentes subjetivos

[0079] Una variedad de agentes objetivos son útiles en las composiciones descritas aquí. Típicamente, los agentes objetivo se unen a una estructura cargada negativamente como se describe para las porciones formadoras de imagen anteriores. Los agentes objetivo pueden ser cualquier elemento que haga dirigir un agente terapéutico u otro componente de la composición a un sitio particular o alterar el tropismo del complejo relacionado con aquel del complejo sin el agente objetivo. El agente objetivo puede ser un agente objetivo extracelular. Tal un agente también puede ser un agente objetivo intracelular, que permita a un agente terapéutico ser dirigido hacia compartimientos celulares particulares (por ejemplo, mitocondria, núcleo, y similares). El agente más simple puede ser un anión pequeño que, por virtud del cambio de la distribución de cargas neta, altera el tropismo del complejo de más superficies celulares altamente negativas y componentes de matriz extracelular a una variedad más amplia de células o aún específicamente lejos de las superficies más altamente negativas.

[0080] El agente objetivo o agentes se enlazan preferiblemente, covalente o no covalentemente, a una estructura cargada negativamente de acuerdo con la invención. De acuerdo con una forma preferida de la invención, el agente objetivo

se une covalentemente al poliaspartato, dextran fosforilado o sulfatado, y similares que sirven como un componente de estructura cargado negativamente, preferiblemente por vía de un grupo de enlace. En un grupo de modalidades, y el agente objetivo es un péptido fusogénico para promover la transfección celular (es decir, para favorecer el pasaje de la composición o de sus varios elementos a través de las membranas, o para ayudar en el egreso de los endosomas o para cruzar la membrana celular). El agente objetivo también puede ser un ligando receptor de células para un receptor que está presente en la superficie del tipo de célula, tal como, por ejemplo, un azúcar, transferán, o una proteína asialo-orosomucoide.

[0081] Otros agentes objetivos útiles incluyen azúcares, péptidos, hormonas, vitaminas, citoquinas, aniones pequeños, lípidos o secuencias o fracciones derivadas de estos elementos y que permiten la unión específica con sus receptores correspondientes. Preferiblemente, los agentes objetivo son azúcares y/o péptidos de ligandos de receptores de células o fragmentos de estos, receptores o fragmentos de receptores, y similares. Más preferiblemente, los agentes objetivo son ligando de receptores de factor de crecimiento, de receptores de citoquina, de receptores de lectina de célula o de receptores de proteína de adhesión. El agente objetivo también puede ser un azúcar que hace posible objetivar lectinas tales como receptores de asialo glicoproteína.

[0082] En todavía otras modalidades, un agente objetivo se utiliza en la ausencia de una estructura cargada negativamente. En este grupo de modalidades, el agente objetivo lleva suficientes porciones cargadas negativamente para formar un complejo iónico con el portador cargado positivamente descrito anteriormente. En estos casos, la sustancia o un derivado

de esta tiene suficiente carga negativa para asociarse con los portadores cargados positivamente de la presente invención no covalentemente. El término "suficiente" en este contexto se refiere a una asociación que se puede determinar por ejemplo, al cambiar el tamaño de partícula o espectrofotometría funcional versus los componentes solos. Agentes objetivo cargados negativamente adecuados para este grupo de modalidades son agentes objetivos basados en proteína que tienen una carga negativa neta en pH fisiológico, así como también agentes objetivo que pueden facilitar la adhesión a una superficie celular particular, tal como polianiones pequeños (por ejemplo, fosfato, aspartato y citrato) que pueden cambiar el objetivo basado en la carga de superficie neta de la célula a ser objetivada.

Agentes Biológicamente Activos

[0083] Una variedad de agentes biológicamente activos, incluyen agentes terapéuticos y cosméticos, que son útiles en la presente invención y están presentes en una cantidad efectiva que dependerá de la condición a ser tratada, profilácticamente o de otra forma, la ruta de administración, la eficacia del agente y el tamaño del paciente y susceptibilidad al régimen de tratamiento.

[0084] Como se anotó previamente, la invención excluye específicamente las toxina botulinum, VEGF y fragmentos de anticuerpo cuando se emplea el término "terapéutico" o "proteína biológicamente activo". Más aún, la invención excluye específicamente proteínas terapéuticas capaces de lograr alteraciones terapéuticas de los niveles de glucosa sanguínea (por ejemplo, para tratar hiperglicemia), tal como insulina. En razón a que los antígenos adecuados para inmunización tienen otras actividades biológicas (tal como montaje de una respuesta inmune), estas permanecen incluidas en los aspectos apropiados de

esta invención, sin embargo. Los agentes antigénicos adecuados para inmunización pueden ser antígenos basados en proteínas que no alteran terapéuticamente los niveles de glucosa sanguínea, agentes no nucleótido no proteína o híbridos de estos. Nucleótidos que codifican antígenos son específicamente no adecuados para las composiciones de la presente invención, sin embargo. Así, los agentes incluidos son antígenos de ellos mismos adecuados para inmunización. Antígenos adecuados incluyen, por ejemplo, aquellos para agentes ambientales, patógenos o biorriesgosos. Agentes antigénicos adecuados preferiblemente incluyen, por ejemplo, tratamientos relacionados con antígenos para malaria, rabia, ántrax. Tuberculosis o inmunizaciones relacionadas con niños tales como hepatitis B, difteria, pertusis, tétano, hemofilia influenza tipo B, poliovirus inactivado, paperas, sarampión, rubéola, varicela, neumococo, hepatitis A e influenza.

[0085] Agentes terapéuticos adecuados que se pueden adherir a una estructura cargada negativamente se puede encontrar en esencialmente cualquier clase de agentes, que incluyen, por ejemplo, agentes analgésicos, agentes antiasmáticos, antibióticos, agentes antidepresivos, agentes antidiabéticos, agentes antifúngicos, antieméticos, antihipertensivos, agentes antiimpotencia, agentes antiinflamatorios, agentes antineoplásicos, agentes anti-HIV, agentes antivirales, agentes ansiolíticos, agentes de contracepción, agentes de fertilidad, agentes antitrombóticos, agentes protrombóticos, hormonas, vacunas, agentes inmunosupresivos, vitaminas y similares. Alternativamente, se pueden introducir suficientes grupos cargados negativamente dentro del agente terapéutico para producir complejación iónica con las estructuras cargadas positivamente descritas anteriormente. Muchos métodos adecuados tales como la fosforilación o sulfación existen como será evidente para un experto en la técnica.

[0086] Adicionalmente, estos agentes poseen ellos mismo porciones cargadas negativamente adecuadas para asociarse con el portador cargado positivamente descrito anteriormente y no requieren la unión a una estructura cargada negativamente. En estos casos, la sustancia o un derivado de esta tiene suficiente carga negativa para asociarse con los portadores cargados positivamente de la presente invención no covalentemente. El término "suficiente" en este contexto se refiere a una asociación que se puede determinar por ejemplo al cambiar de partícula o espectrofotometría funcional versus los componentes solos.

[0087] Agentes cosméticos adecuados incluyen, por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico (EGF), así como también hormona de crecimiento humano, y antioxidantes.

[0088] Más particularmente, los agentes terapéuticos útiles en la presente invención incluyen tales analgésicos como dilocaína, novocaína, bupivacaína, tetracaína, benzocaína, cocaína, mepivacaína, etidocaína, ropivacaína, prilocaína y similares; agentes antiasmáticos tales como acelastina, ketotifeno, traxanox, corticosteroides, cromolin, nedocromil, albuterol, bitolterol mesilato, pirbuterol, salmeterol, terbutilina, teofilina y similares; agentes antibióticos tales como neomisina, streptomisina, cloramfenicol, norfloxacina, ciprofloxacina, trimetoprim, sulfametiloaxazol, los antibióticos, tetraciclina β -lactam, agentes antidepresivos tales como nefopam, oxipertina, imipramina, trazadona y similares; agentes antidiabéticos tales como biguanidinas, sulfonilureas, y similares; antieméticos y antisicóticos tales como cloropromazina, flufenazina, perfenazina, proclorperazina, prometazina, thietilperazina, triflupromazina, haloperidol, escopolamina, difenidol,

trimetobenzamida, y similares; agentes neuromusculares tales como atracurium, mivacurium, rocuronium, succinilcolina, doxacurium, tubocurarina; agentes antifugales tales como amfoterisina B, nistatina, candicidina, itraconazol, ketoconazol, miconazol, clotrimazol, fluconazol, ciclopirox, econazol, naftilina, terbinafina, griseofulvina, ciclopirox y similares; agentes antihipertensivos tales como propanolol, propafenona, oxiprenolol, nifedipina, reserpina y similares; agentes de anti impotencia tales como óxido nítrico y similares ; agentes anti inflamatorios que incluyen agentes antiinflamatorios tales como cortisona, hidrocortisona, dexametasona, prednisolona, prednisona, fluazacort, y similares , tales como agentes antiinflamatorios no esteroides tales como indometacina, ibuprofeno, ramifenizone, piroxicam similares; agentes antineoplásicos tales como adriamicina, ciclofosfamida, actinomicina, bleomicina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, mitomicina, rapamicina, metotrexato, fluorouracil, carboplatin, camustina (BCNU), cisplatina, etoposida, interferones, fenesterina, taxol (que incluye análogos y derivados), camptotecina y derivados como, vinblastina, vincristina y similares; anti-HF/ agentes (e.g., antiproteolíticos); agentes antivirales tales como amantadina, metisazona, idoxuridina, citarabina, aciclovir, famciclovir, ganciclovir, foscarnet, sorivudina, trifluridina, valaciclovir, cidofovir, didanosina, estavudina, zalcitabina, zidovudina, ribavirin, rimantadina y similares; agentes ansiolíticos tales como dantrolene, diazepam y similares ; inhibidores COX-2; agentes de contracepción tales como progestogen y similares; agentes antitrombóticos tales como inhibidores GPIIb/IIIa, activadores de plasminógeno, estreptoquinasa, uroquinasa, heparina y similares; agentes protrombóticos tales como factores trombón V, VII, VIII y similares ; hormonas tales como hormonas de crecimiento, prolactina, EGF (factores de crecimiento) y similares; agentes inmunosupresores tales como ciclosporina, azatiopreno, mizorobina, FK506, prednisona y similares; vitaminas tales como A, D, E, K y similares; y otras

terapéuticamente o agentes médicamente activos tales como. Ver, por ejemplo, GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, Ninth Ed. Hardman, et al., eds. McGraw-Hill, (1996).

[0089] En la mayoría de modalidades preferidas, el agente biológico se selecciona de proteína que tiene un peso molecular menor de 20,000 kD y otros agentes biológicamente activos tales como, por ejemplo, un agente terapéutico no proteína no nucleótido tal como ciertos antifúngicos, y agentes antigénicos para inmunización. Como en todos los aspectos de la presente invención, ejemplo adecuados excluyen específicamente insulina, toxinas botulinum, VEGF y fragmentos de anticuerpo.

[0090] Como se anotó anteriormente para los agentes objetivo y los agentes formadores de imagen, ciertos agentes biológicos o cosméticos se pueden utilizar en la ausencia de una estructura cargada negativamente. Tales agentes biológicos o cosméticos son aquellos que llevan generalmente una carga neta negativa en el pH fisiológico para formar un complejo con el portador cargado positivamente. Ejemplos incluyen antígenos para inmunización que incluyen típicamente proteínas o glicoproteínas, y muchos agentes antifúngicos, así como también agentes para formación de imágenes objetivadas de melanoma con o sin potencial terapéutico inherente. En estos casos, la sustancia o derivado de esta tiene suficiente carga negativa para asociarse con los portadores cargados positivamente de la presente invención no covalentemente. El término "suficiente" en este contexto se refiere a una asociación que se puede determinar por ejemplo al cambiar el tamaño de partícula o espectrometría funcional versus los componentes solos.

Estructuras cargadas negativamente que tienen porciones formadoras de imágenes adheridas, agentes objetivo o agentes terapéuticos

[0091] Para tres de los anteriores grupos de componentes, que incluyen porciones formadoras de imagen, agentes objetivo y agentes terapéuticos, los componentes individuales se una a una estructura cargada negativamente, modificada covalentemente para introducir porciones cargadas negativamente, o empleadas directamente si el compuesto contiene suficientes porciones cargadas negativamente para conferir complejación iónica a la estructura cargada positivamente descrita anteriormente. Cuando es necesario, típicamente, la adición es por vía de un grupo de enlace utilizado para unir covalentemente el agente particular a la estructura a través de grupos funcionales presentes en el agente así como también la estructura. Una variedad de grupos de enlace son útiles en este aspecto de la invención. Ver, por ejemplo, Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, CA (1996); Wong, S. S., Ed., *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL (1991); Senter, et al., *J Org. Chem.* 55:2975-78 (1990); and Koneko, et al. *Bioconjugate Chem.* 2:133-141 (1991).

[0092] En algunas modalidades, los agentes terapéuticos, de diagnóstico u objetivo no tendrán un grupo funcional disponible para adherirse a un grupo de enlace, y pueden ser primero modificados para incorporar, por ejemplo, un sustituyente hidroxilo, amino o tiol. Preferiblemente, el sustituyente se suministra en una porción no interfiriendo del agente, que se puede utilizar para adherirse a un grupo de enlace, y no afectará adversamente la función del agente.

[0093] En aun otro aspecto la presente invención suministra composiciones que comprenden un complejo no covalente de una estructura cargada positivamente que tiene al menos un grupo adherido eficientemente y en este aspecto de la invención, la estructura cargada positivamente puede ser esencialmente cualquiera de las estructuras cargadas positivamente descritas anteriormente, y también comprenderá (como con las estructuras seleccionadas anteriormente). Al menos un grupo adherido eficientemente. Los grupos de eficiencia adecuados incluyen $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, en donde el subíndice $n1$ es un entero que va de 3 a aproximadamente 5, y el subíndice $n2$ es independientemente un entero impar que va aproximadamente 7 a aproximadamente 17; o dominios TAT. Por ejemplo, los dominios TAT pueden tener la fórmula $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$ o $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$ en donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un entero que va de 0 a 20 y el fragmento se adhiere a la molécula portadora por vía del C- terminal o el N- terminal del fragmento. Los grupos laterales ramificados pueden tener el la forma D o L (configuración R o S) en el centro de la unión. Fragmentos de HIV-TAT preferidos son aquellos en los que los subíndices p y q son cada uno independientemente enteros que van de 0 a 8, más preferiblemente 2 a 5.

Administración transdérmica de ciertas otras moléculas

[0094] Se ha encontrado que portadores cargados positivamente como se discutió anteriormente se pueden utilizar para suministro transdérmico de proteínas y otros agentes biológicamente activos (por ejemplo proteínas que tienen un peso molecular de menos de 20,000 kD, agentes terapéuticos no nucleótido o proteína tales como ciertos agentes antifúngicos, o agentes

antigénicos para inmunización). El uso de portadores cargados positivamente permite la transmisión de la proteína o gen marcador dentro y fuera de las células de la piel, y el suministro de este en una cantidad efectiva y forma activa para un tejido subyacente. El suministro local en esta forma puede producir reducción de dosis, reducir la toxicidad y permitir optimización de dosis más precisa para efectos deseados relacionados con materiales inyectables o implantables, particularmente en el caso de agentes antifúngicos, agentes antigénicos adecuados para inmunización, o agentes para formación de imágenes moleculares de desórdenes de la piel tales como melanoma- esta modalidad puede incluir una cantidad de unos aniones polivalentes preferiblemente pequeños, (por ejemplo, fosfato, aspartato, o citrato), o se pueden llevar a cabo en la ausencia sustancial de tal un polianión.

[0095] De forma similar, el término "proteína" incluye proteínas extraídas de fuentes naturales, así como también proteínas que se pueden obtener sintéticamente, por vías de medios químicos o recombinantes. La proteína también puede estar en una forma modificada o en la forma de, por ejemplo un péptido recombinante una proteína de fusión o una molécula híbrida. La proteína en algunos casos puede ser una porción de una molécula de proteína mayor que posee la actividad necesaria. Proteínas preferibles son aquellas que tienen un peso molecular menos de 20,000 kD [por ejemplo aquellas que se pueden utilizar en composiciones transdérmicas y métodos, tales como antígenos para inmunización], que pueden variar ampliamente las propiedades fisicoquímicas. De esta manera los agentes terapéuticos no nucleótido no proteína, que incluyen agentes antifúngicos, se puede obtener de fuentes naturales o se pueden sintetizar.

[0096] Las composiciones de esta invención están preferiblemente en la forma de productos para ser aplicados a la piel o epitelio de sujetos o pacientes (es decir humanos u otros mamíferos en necesidad del tratamiento particular). El término "en necesidad" significa que incluye necesidades farmacéuticas y necesidades relacionadas con la salud así como también necesidades que tienden a ser más cosméticas, estéticas, o subjetivas. La composición también se puede utilizar, por ejemplo, para alterar o mejorar la apariencia del tejido facial.

[0097] En general, las composiciones se preparan al mezclar proteínas particularmente aquellas que tienen un peso molecular menor de 20,000 kd u otros agentes biológicamente activos tales como por ejemplo, un agente terapéutico no nucleótido no proteína o alternativamente un agente para inmunización para ser administrado con el portador cargado positivamente, y usualmente con uno o más portadores adicionales farmacéuticamente aceptables o excipientes. En su forma más simple ellos pueden contener un portador farmacéuticamente adecuado acuoso simple o diluyente, tal como salina, que puede ser amortiguada. Sin embargo, las composiciones pueden contener otros ingredientes típicos en composiciones farmacéuticas tópicas o cosméticas que incluyen un portador dermatológico o farmacéuticamente aceptable, vehículo o medio (es decir, un portador, vehículo o medio que es compatible con los tejidos a los que ellos se aplicaran). El término "aceptable dermatológica o farmacéuticamente aceptable", como se utiliza aquí, significa que las composiciones o componentes de estos son adecuados para uso en contacto con estos tejidos o para uso en pacientes en general sin toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica, y similares. Como es apropiado, las composiciones de la invención pueden comprender cualquier ingrediente utilizado convencionalmente en los campos bajo consideración, y particularmente en

cosmética y dermatología. En todos los aspectos de esta invención, la asociación entre el portador y el agente biológicamente activo es mediante interacción no covalente, que puede incluir, por ejemplo, interacciones iónicas, unión de hidrógeno, fuerzas van de Waals o combinaciones de estos.

[0098] Las composiciones se pueden preformular o se pueden preparar al tiempo de administración, por ejemplo, al suministrar un kit para ensamble en o antes del tiempo de administración. Alternativamente, como se mencionó anteriormente, las proteínas terapéuticas y la estructura cargada positivamente, se puede administrar en forma separada al paciente, por ejemplo al suministrar un kit que contiene un parche para piel u otro dispositivo dispensador que contiene la proteína terapéutica y un líquido, gel, crema o similar que contiene el atador cargado positivamente (y opcionalmente otros ingredientes). En esa modalidad particular, la combinación se administra al aplicar el líquido u otra composición que contiene el portador a la piel, seguido por la aplicación del parche de piel u otro dispositivo.

[0099] La composición de la invención se aplica con el fin de administrar una cantidad efectiva de unas proteínas terapéuticas u otras sustancias benéficas, tal como un formador de imagen o agente objetivo. Para el suministro transdérmico el término "cantidad efectiva" se refiere a cualquier composición o método que provee mayor suministro transdérmico del agente biológicamente activo con relación al agente en la ausencia del portador. Por antígenos "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad suficiente para permitir a un sujeto montar una respuesta inmune para el antígeno después de aplicación o una serie de aplicaciones del antígeno. Por agente antifúngico, "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad suficiente para reducir los síntomas o signos de infección fúngica. Para otros

agentes biológicamente activos que no alteran terapéuticamente los niveles de glucosa sanguínea, "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad suficiente para ejercer el efecto biológico o terapéutico definido caracterizado porque el agente en, por ejemplo, el Physicians' Desk Reference o similares sin inducir toxicidad significativa. La invención excluye específicamente fragmentos de anticuerpo cuando el término "terapéutico" o "proteína biológicamente activa" se emplea. En razón a que los antígenos adecuados para inmunización tienen otras actividades biológicas tales como montaje de una respuesta inmune, estos permanecen incluidos en los aspectos apropiados de esta invención, sin embargo.

[0100] Las composiciones pueden tener una cantidad apropiada de una proteína terapéutica y un agente biológico activo de una aplicación de una dosis simple un tratamiento de dosis simple, o puede ser más concentrada, sea para dilución en el lugar de administración o para uso en múltiples aplicaciones. En general, las composiciones que contienen proteínas (particularmente aquellas que tienen una peso molecular menor de 20,000 kD), u otros agentes biológicamente activos contendrán cerca de 1×10^{-20} a aproximadamente 25% en peso del agente biológicamente activo y de cerca de 1×10^{-19} a aproximadamente 30% en peso del portador cargado positivamente. En general, las composiciones que contienen un agente terapéutico no proteína no nucleótido o alternativamente un agente para inmunización contendrán de cerca de 1×10^{-10} a aproximadamente 49.9% en peso del antígeno y de cerca de 1×10^{-9} a aproximadamente 50% en peso del portador cargado positivamente. La cantidad de molécula portadora o la proporción de esta para el agente biológicamente activo dependerá de que portador se escoja para uso en la composición en cuestión. La cantidad apropiada o proporción de molécula portadora en un caso dado se puede determinar fácilmente, por ejemplo, al conducir uno o más experimentos tales como aquellos descritos adelante.

[0101] Las composiciones de esta invención pueden incluir soluciones, emulsiones (que incluyen microemulsiones), suspensiones, cremas, lociones, geles, polvos, u otras composiciones sólidas o líquidas típicas utilizadas para aplicación a la piel y otros tejidos en donde las composiciones se pueden utilizar. Tales composiciones pueden contener, en adición a los agentes biológicamente activos y la molécula portadora, otros ingredientes típicamente usados en tales productos, Tales como antimicrobiales, humectantes y agentes de hidratación, agentes de penetración, preservativos, emulsificadores, aceites naturales o sintéticos, solventes, tensoactivos, detergentes, agentes de gelación, emolientes, antioxidantes, fragancias, llenadores, espesantes, ceras, absorbedores de olor, tintes, agentes colorantes, polvos, agente de control de viscosidad y agua, y opcionalmente incluyen anestésicos, aditivos anti-irritantes, extractos botánicos, agentes de acondicionamiento, agentes de obscurecimiento o aclaración, gliter, humectantes, mica, minerales, polifenoles, siliconas o derivados de estos, bloqueadores solares, vitaminas, y fitomedicinas.

[0102] Las composiciones de acuerdo con esta invención puede estar en la forma de composiciones de liberación sostenida o liberación controlada, en donde la sustancia de proteínas a ser administrada y el portador se encapsulan o se contienen de otra forma dentro de una material de tal forma que ellos se liberan sobre la piel en una forma controlada durante el tiempo. Esta sustancia para ser administrada y el portador pueden estar contenidos dentro de matrices, liposomas, vesículas, microcápsulas, microesferas y similares, o dentro de un material particulado sólido, todos los cuales se seleccionan y/o se construyen para suministrar liberación de la sustancia o sustancias durante el tiempo. La sustancia

terapéutica y el portador se pueden encapsular junto (es decir, en la misma capsula) o separadamente (en cápsulas separadas).

[0103] La administración de las composiciones de esta invención a un sujeto es, por supuesto, otro aspecto de la invención.

[0104] La administración por parte de pieles similares con liberación controlada y/o monitoreo probablemente es un método común, de tal forma que la composición de esta invención a menudo suministrará como contenido en un parche de piel u otro dispositivo. En el caso de antígenos adecuados para inmunizaciones, más preferiblemente las composiciones se administran por o bajo la dirección de un médico u otro profesional de la salud. Ellos pueden ser administrados en un tratamiento único o en una serie de tratamientos periódicos durante el tiempo. Para suministro transdérmico de antígenos adecuados para inmunizaciones para los propósitos mencionados anteriormente, una composición como se describió anteriormente se aplica tópicamente a la piel o a una placa de uña y piel circundante. De forma similar, en el caso de terapéuticos no proteína no nucleótido tales como agentes antifúngicos, preferiblemente las composiciones son administradas bajo la dirección de un médico u otro profesional de la salud. Ellos se pueden administrar en un tratamiento único o en una serie de tratamiento periódicos durante el tiempo. Para suministro transdérmico de proteínas terapéuticas se aplica una composición como se describió anteriormente tópicamente a la piel.

[0105] Kits para administrar las composiciones de las invenciones, ya sea bajo dirección de un profesional para el cuidado de la salud o por el paciente o sujeto, también puede incluir un aplicador habitual adecuado para ese propósito.

En el caso de un aplicador a la uña de un dedo o a la uña del dedo de un pie o estructuras anatómicas circundantes, tal como un aplicador habitual pueden incluir por ejemplo una placa de uña protésica, una laca, un esmalte para uñas con un agente de color, un gel, o una combinación de cualquiera o todos los anteriores.

[0106] En otro aspecto, la invención se relaciona con métodos para la administración tópica de la combinación del portador cargado positivamente descrito anteriormente con una cantidad efectiva de una agente biológicamente activo (por ejemplo, unas proteínas con un peso molecular de menos de 20,000 kD, antígenos adecuados para inmunización, agentes antifúngicos o un agente terapéutico no proteína, no nucleótido). Como se describió anteriormente, la administración se puede efectuar mediante el uso de una composición de acuerdo con la invención que contiene tipos apropiados y cantidades de estas dos sustancias específicamente portador y agente biológicamente activo. Sin embargo, la invención también incluye la administración de estas dos sustancias en combinación, aunque no necesariamente en la misma composición. Por ejemplo, la sustancia terapéutica puede ser incorporada en forma seca en un parche para piel u otro dispositivo dispensador y el portador cargado positivamente se puede aplicar a la superficie de la piel antes de la aplicación del parche de tal forma que los dos actúan juntos, resultando en el suministro transdérmico deseado. En este sentido, las dos sustancias (portador y agente biológicamente activo) actúan en combinación o quizá interactúan para formar una composición o combinación in situ.

Métodos de Preparación de las Composiciones

[0107] En otro aspecto, la presente invención suministra un método para preparar una composición farmacéutica, el método comprende combinar un componente de estructura cargado positivamente y al menos un miembro seleccionado de:

- i) una primera estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de porciones formadoras de imagen adheridas, o una pluralidad de porciones formadoras de imagen cargadas negativamente;
- ii) una segunda estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de agente objetivo adheridas, o una pluralidad de porciones objetivos cargadas negativamente;
- iii) un agente biológicamente activo no proteína no nucleótido
- iv) una proteína terapéutica diferente de insulina, toxinas botulinum, VEGF, u otros fragmentos de anticuerpos con un portador farmacéuticamente aceptable para formar un complejo no covalente que tiene una carga positiva neta.

[0108] En algunas modalidades de esta invención, la estructura cargada positivamente o portador puede ser usado sólo para proveer suministro transdérmico de ciertos tipos de sustancias. Aquí, se prefieren composiciones y métodos que comprenden cerca de 1×10^{-20} a aproximadamente 25% en peso del agente biológicamente activo y de cerca de 1×10^{-19} a aproximadamente 30% en peso del portador cargado positivamente. También se prefieren composiciones y métodos que contienen un terapéutico no proteína no nucleótido tales como un

agente antifúngico, agentes formadores de imagen selectivos para diagnósticos de desordenes de la piel tales como melanoma, o un agente antigénico adecuado para inmunización, en donde las composiciones y métodos contienen de 1×10^{-10} a aproximadamente 49.9% en peso del antígeno y de cerca de 1×10^{-9} a aproximadamente 50% en peso del portador cargado positivamente.

[0109] La amplia aplicabilidad de la presente invención se ilustra por la facilidad con la que una variedad de composiciones farmacéuticas se puede formular. Típicamente, las composiciones se preparan al mezclar el componente de estructura cargado positivamente con los componentes deseados de interés (por ejemplo, componentes terapéuticos, objetivos, o formadores de imagen) en proporciones y una secuencia para obtener composiciones que tienen una carga positiva neta variable. En muchas modalidades, las composiciones se pueden preparar, por ejemplo, en cabecera utilizando portadores farmacéuticamente aceptables y diluyentes para administración de la composición. Alternativamente, las composiciones se pueden preparar al mezclar en forma adecuada los componentes y luego liofilizarlos y almacenarlos (típicamente a temperatura ambiente o por debajo) hasta que se utilice o se formule en un vehículo de suministro adecuado.

[0110] Las composiciones se pueden formular para suministrar mezclas adecuadas para varias formas de administración, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen tópica, cutánea, oral, rectal, vaginal, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraocular, y transdérmica. Las composiciones farmacéuticas de la invención contienen preferiblemente un vehículo que es farmacéuticamente aceptable para una formulación inyectable, en particular para inyección directa en el órgano deseado, o para administración

tópica (a la piel y/o membrana mucosa). Las composiciones farmacéuticas pueden en particular ser estériles, soluciones isotónicas o composiciones secas (por ejemplo, composiciones secadas por congelamiento), que se pueden reconstituir por la adición de agua esterilizada o salina fisiológica, para preparar las soluciones inyectables.

[0111] Alternativamente, cuando las composiciones son para ser aplicadas tópicamente (es decir, cuando se desea suministro transdérmico) el componente o componentes de interés se puede aplicar en forma seca a la piel (por ejemplo, por vía de la utilización de un parche para piel), en donde la piel se trata separadamente con la estructura cargada positivamente o portador. De esta forma la composición general se forma esencialmente in situ y se administra al paciente o sujeto.

Métodos para Usos de las Composiciones

Métodos de suministro

[0112] Las composiciones de la presente invención pueden ser suministradas a un sujeto, célula o sitio objetivo, sea in vivo o ex vivo utilizando una variedad de métodos, de hecho, cualquiera de las rutas normalmente utilizadas para introducir una composición en contacto íntimo con el tejido a ser tratado se puede utilizar. Preferiblemente, las composiciones se administraran con portadores farmacéuticamente aceptables. Métodos adecuados para administrar tales compuestos están disponibles y son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Aunque se puede utilizar más de una ruta para utilizar una composición particular, a menudo una ruta particular puede suministrar una reacción inmediata

y más efectiva que la otra ruta. Portadores farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se administra, así como también por el método particular utilizado para administrar la composición. De acuerdo con esto existe una amplia variedad y formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas de la presente invención (ver, por ejemplo, *Remington's Farmacéutico Sciences*, 17th ed. 1985).

[0113] La administración puede ser, por ejemplo, intravenosa, tópica, intraperitoneal, subdérmica, subcutánea, transcutánea, intramuscular, oral, intraarticular, parenteral, intranasal, o por inhalación. Los sitios adecuados de administración incluyen así, pero no están limitados a, la piel, bronquios, tracto gastrointestinal, ojos y oído. Las composiciones incluyen típicamente un portador farmacéutico convencional o excipiente y puede incluir adicionalmente otros agentes medicinales, portadores, adyuvantes, y similares. Preferiblemente, la formulación será de cerca de 5% a 75% por peso de una composición de la invención, con un restante que consiste de excipientes farmacéuticos adecuados. Excipientes apropiados se pueden adaptar a la composición particular y ruta de administración por métodos bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, *REMMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18TH ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990))*).

[0114] Las formulaciones pueden tomar la forma de sólidos, semisólidos, polvos liofilizados, o formas de dosis líquidas, tales como, por ejemplo, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones, emulsiones, supositorios, enemas de retención, cremas, ungüentos, lociones, aerosoles o similares. En las modalidades en donde la composición farmacéutica toma la forma de una píldora, tableta o cápsula, la formulación puede contener, junto con la composición

biológicamente activa, cualquiera de los siguientes: un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicalcio, y similares; un desintegrante tal como almidón o derivados de estos; un lubricante tal como estearato de magnesio y similares; un ligador tal como almidón, goma acacia, polivinilpirrolidona, gelatina, celulosa y derivados de estos. Se pueden presentar composiciones en contenedores de dosis unitarias o multidosas selladas, tal como ampollas o frascos. Las dosis administradas a un paciente deben ser suficientes para alcanzar una respuesta terapéutica benéfica en el paciente durante el tiempo.

[0115] En algunas modalidades, una formulación de liberación sostenida se puede administrar a un organismo o a las células en cultivo y pueden llevar las composiciones deseadas. La composición de liberación sostenida se puede administrar al tejido de un organismo, por ejemplo, por inyección. Por "liberación sostenida", significa que la composición se hace disponible para la toma al rodear el tejido o las células en cultivo durante un periodo de tiempo mayor que se puede alcanzar por la administración de la composición en un medio menos viscoso, por ejemplo, una solución salina.

[0116] Las composiciones, solas o en combinación con otros componente adecuados se puede hacer en formulaciones de aerosol (es decir, ellas se pueden "nebulizar") para ser administradas por vía de inhalación. Las formulaciones de aerosol se pueden colocar en propulsores presurizados aceptables, tal como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares. Para administración por inhalación, las composiciones también se pueden suministrar como polvo seco (por ejemplo, Nektar).

[0117] Las formulaciones adecuadas para administración parenteral, tales como, por ejemplo, por inyección intravenosa, intramuscular, intradérmica, y rutas subcutánea, que incluyen soluciones de inyección estéril isotónica acuosa y no acuosa, que pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacteriostatos, y solutos que dan la formulación isotónica y compatible con la sangre del recipiente propuesto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizadores, agentes espesantes, estabilizadores, y preservativos.

[0118] Otros métodos de administración incluyen, pero no están limitados a, administración utilizando balones angioplásticos, catéteres, y formaciones de gel. Los métodos para balón angioplástico, catéter y suministro de formación de gel son bien conocidos en la técnica.

Métodos de formación de imágenes

[0119] Un experto en la técnica entenderá que las composiciones de la presente invención se pueden adaptar para una variedad de usos de formación de imágenes. En una modalidad, la colonoscopia virtual se puede desarrollar utilizando el sistema basado en componentes para formación de imágenes. Actualmente, la colonoscopia virtual involucra esencialmente la infusión en contraste en un colón y visualizar las imágenes en CT, luego reconstruir una imagen 3-D. Se pueden emplear técnicas similares para MR. Sin embargo, las heces, mucosas y aire, todos sirven como barreras de contraste y pueden dar una superficie artificial para la reconstrucción de la pared del colón. Adicionalmente a un contraste de objetivo celular que podría ayudar a superar estas barreras suministra una reconstrucción de pared real y ayuda a evitar falsos positivos y

falsos negativos. Existen varias formas que el sistema basado en componentes puede aplicar aquí. De forma más simple, la estructura de la eficiencia catiónica se puede aplicar con un agente de contraste único, por ejemplo un CT, MR, o agente de contraste óptico. Así, la capa de superficie celular se puede visualizar y cualquier irregularidad u obstrucciones detalladas en la reconstrucción de imagen. Sin embargo, el sistema basado en componentes ofrece una opción adicional para agregar un segundo agente específico. Este agente puede consistir de una estructura de eficiencia catiónica, una porción de formación de imagen diferente, y componentes de objetivo, por ejemplo, objetivar dos antígenos característicos de cáncer de colon. Las porciones formadores de imagen a partir del simple diagnóstico se puede seleccionar de tal forma que uno sea contraste CT y el otro sea contraste MR, de tal forma que ambos sean contraste MR siendo uno un agente T2 y el otro un agente T1. De esta manera, la superficie se puede reconstruir como se hizo anteriormente, y cualquier región específica para un antígeno de tumor se puede visualizar y sobreponer la reconstrucción original. Adicionalmente, los agentes terapéuticos se pueden incorporar en el sistema de diagnóstico objetivado también. Estrategias similares se pueden aplicar a la enteritis regional y colitis ulcerativa (y de nuevo combinar con terapias). Alternativamente, las porciones formadoras de imagen óptica y los métodos de detección se pueden emplear, por ejemplo, en el caso del diagnóstico del melanoma o manejo, preferiblemente en conjunto con una porción formadora de una imagen fluorescente. En estas modalidades, la detección puede ser visual, asistida por imagen o completamente basada en imagen por ejemplo mediante análisis de imagen de campo oscuro.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

[0120] Este ejemplo ilustra el suministro transdérmico de un complejo muy grande, a saber un plásmido que contiene el transgen (BFP) de proteína fluorescente azul, que utiliza una estructura cargada positivamente o portador de la invención.

Selección de estructuras:

[0121] La estructura cargada positivamente se ensambla al agregar covalentemente -Gly₃Arg₇ a polilisina PM 150,000 por vía del carboxilo de la glicina terminal a aminas libres de cadenas laterales lisina en un grado de saturación del 18% (es decir, 18 fuera de cada 100 residuos de lisina se unen covalentemente al -Gly₃Arg₇). La estructura modificada se designa "KNR2" para denotar un segundo tamaño del portador de peptidilo. El polication de control es polilisina no modificada (designada "K2", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) del mismo tamaño y del mismo lote. Un polication de control adicional, Superfect® (Qiagen) que es un agente basado en dendrímero activa, se selecciona como una referencia para altos índices de transfección in vitro (es decir, control positivo simultaneo y referencia para eficiencia del estado de la técnica de versus toxicidad in vitro).

Selección de agente terapéutico:

[0122] Un plásmido de 8 kilobase (plantilla basada en pSport, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) que contiene el transgen completo para la proteína azul fluorescente (BFP) y secuencias flanqueadoras dirigidas por un promotor citomegalovirus (CMV) se emplea. El BFP sirve como un marcador identificable para células que se han transfectado, luego transcribe y traduce el gen y se puede visualizar completamente (es decir sin tinte adicional) bajo microscopia de fluorescencia. Así, sólo las células en las cuales el complejo se ha cruzado con la membrana de plasma y la membrana nuclear antes de suministro de carga pueden tener expresión transgen. Este plásmido particular tiene un peso molecular de aproximadamente 2.64 millones, y se selecciona así para evaluar el suministro de terapéuticos muy grandes por vía de estos complejos.

Preparación de las muestras:

[0123] En cada caso, se emplea un exceso de polinización para ensamblar un complejo final que tiene un exceso de carga positiva. Aunque incrementar la densidad de carga aumenta el tamaño (es decir más estructuras presentes por complejo), el incremento en la densidad de factor de eficiencia por complejo puede desviar estos cambios. Así, un óptimo puede ocurrir en bajas proporciones (es decir basado en tamaño) o altas proporciones (es decir basado en densidad de factor de eficiencia) y ambos se evalúan aquí para KNR2. Las proporciones óptimas para la eficiencia del K2 y eficiencia del Superfect se seleccionan basadas en las recomendaciones de los fabricantes y reportes anteriores sobre máxima eficiencia. La dosis de terapéutico-nucleótido se estandariza a través de todos los

grupos en razón al volumen total y pH final de la composición a ser evaluada en el cultivo celular.

[0124] Se preparan las siguientes mezclas:

- 1) K2 en una proporción de carga 4:1 a 0.5 mg/mL de solución de un plásmido que expresa proteína fluorescente azul controlada por un promotor CMV.
- 2) KNR2 en una proporción de 15:1 para una solución de 0.5 mg/mL de un plásmido que expresa proteína fluorescente azul controlada por un promotor CMV.
- 3) KNR2 en una proporción de 10:1 para una solución de 0.5 mg/mL de un plásmido que expresa proteína fluorescente azul controlada por un promotor CMV.
- 4) KNR2 en una proporción de 4:1 para una solución 0.5 mg/mL de un plásmido que expresa una proteína azul fluorescente controlada por un promotor CMV.
- 5) KNR2 en una proporción de 1.25: 1 para una solución de 0.5 mg/mL de un plásmido que expresa una proteína fluorescente azul controlada por un promotor CMV.
- 6) Superfect de acuerdo con la recomendación del fabricante en una proporción de carga 5:1 para una solución de 0.5 mg/mL de un plásmido que expresa proteína fluorescente azul controlada por un promotor CMV.

Protocolo de cultivo celular:

[0125] Todos los experimentos de cultivos se desarrollan por observadores cegados para identificar los grupos de tratamiento. En una placa de 6 pozos, 1.0 mL de cada solución se agrega a 70% de células de músculo liso aórticos o humano primario HA-VSMC confluyente (pasaje 21; ATCC, Rockville, MD) y crecen en M-199 con 10% de suero durante 48 horas a 37 grados Celsius y 10%

CO₂. Los pozos de control no tratados se evalúan así como también cada grupo se evalúa en n=5 pozos por grupo.

Análisis de eficiencia:

[0126] fotografías de baja magnificación (10X total) de placas de células intactas se obtienen por observadores segados a 60 grados, 180 grados y 200 grados de la parte superior de cada pozo utilizando un microscopio de epi-fluorescencia Nikon E600 con filtro BFP y lentes planos apocromat. Se emplea la suite de análisis de imagen Image Pro Plus 3.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) se emplea para determinar el porcentaje de área de célula total que fue positivo. Este resultado fue normalizado para el área total de células para cada uno, y reportado como eficiencia de suministro de gen (% de total de células que expresan transgen a niveles detectables).

Análisis de toxicidad:

[0127] Los pozos se evaluaron posteriormente por observadores segados en un ensayo de exclusión de tinte (las células viables excluyen tinte, mientras que las no viables no lo pueden hacer), seguido por solubilización en 0.4% SDS en salina amortiguada por fosfato. Las muestras se evalúan en un espectrómetro Spectronic Genesys 5 UV/VIS a 595 nm de longitud de onda (azul) para evaluar cuantitativamente las células no viables como una medición directa de la toxicidad directa de agente de transfección. Las muestras se estandarizan para números de células idénticas al ajustar las concentraciones para cazar los valores OD280 antes de las mediciones OD595.

Manejo de datos y análisis estadístico:

[0128] Se determina tñido positivo total por observadores segados por vía de análisis de tanda de imagen utilizando software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) y se normaliza para área de sección transversal total para determinar el porcentaje de tñido positivo para cada. Se determina posteriormente la media y el error estándar para cada grupo con análisis de significancia en 95% de confianza en mediciones ANOVA repetidas de una guía utilizando software Statview (Abacus, Berkeley, CA).

Resultados:**Eficiencias:**

Resultado para eficiencias como sigue (media $\pm$ Error estándar):

- 1) $0.163 \pm 0.106\%$
- 2) $10.642 \pm 2.195\%$
- 3) $8.797 \pm 3.839\%$
- 4) $15.035 \pm 1.098\%$
- 5) $17.574 \pm 6.807\%$
- 6) $1.199 \pm 0.573\%$

Carrera # 4 y # 5 exhiben mejoramiento significativo estadísticamente ($P < 0.05$ por una medición de factor ANOVA repetida con ensayo Fisher PLSD y TUKEY-A posthoc) de eficiencia de suministro de gen relacionada con polilisina sola y Superfect.

Toxicidades:

[0129] Los datos de toxicidad media son como siguen (reportado en AU en OD595; valores bajos, tales como los actuales con salina sola se correlaciona con baja toxicidad, mientras que valores mayores, tales como los actuales en condición 1 indican una alta toxicidad):

Salina - 0.057 A;

1) 3.460 A;

2) 0.251 A;

3) 0.291 A;

4) 0.243 A;

5) 0.297 A;

6) 0.337 A.

Conclusiones:

[0130] Un suministro de gen más eficiente, menos toxico, se puede acompañar con una proporción de 1.25 a 4.0 de KNR2 para DNA que los controles, aún aquellos del Superfect estándar dorado actual. Este experimento confirma la capacidad de suministrar bastantes complejos terapéuticos grandes a través de membranas que utilizan este portador.

Ejemplo 2

[0131] Este ejemplo ilustra el transporte de un nucleótido grande a través de la piel mediante un portador de la invención después de una administración única.

Selección de estructura:

[0132] Se ensambla la estructura cargada positivamente al unir covalentemente -Gly₃Arg₇ a polilisina (PM 150,000) por vía del carboxilo de la glicina terminal a aminas libres de cadenas laterales de lisina en un grado de saturación del 18% (es decir, 18 fuera de cada 100 residuos de lisina se unen covalentemente a un -Gly₃Arg₇). La estructura modificada se designa "KNR2" como se hizo anteriormente. El polication de control fue polilisina no modificada (designada "K2", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) del MISMO TAMAÑO Y DEL MISMO LOTE. Un polication de control adicional, Superfect (Qiagen) que es un agente basado en dendrímero activado, se selecciona como una referencia para altos índices de transfección (es decir control positivo simultáneo y referencia para eficiencia del estado de la técnica versus toxicidad in vitro).

Selección de agente terapéutico:

[0133] Para el presente experimento, se emplea un plásmido de 8.5 kilobase (plantilla basada en pSport, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) que contiene el transgen completo para E. Coli beta-galactosidasa (β gal) y secuencias flanqueadoras parciales dirigidas por un promotor de citomegalovirus (CMV). Aquí el β gal sirve como un marcador identificable para células que se han transfectado, luego transcribe y traduce el gen y se puede visualizar directamente después de tefido específico para la encima externa. Así, sólo las células en las que el complejo tiene piel cruzada alcanzan luego la célula objetivo y se traslocan a través de la membrana de plasma y la membrana nuclear antes de suministro de la carga y pueden tener expresión de transgen. Este plásmido particular tiene un peso molecular de aproximadamente 2,805,000.

Preparación de muestras:

[0134] En cada caso, un exceso de policación se emplea para ensamblar un complejo final que tiene un exceso de carga positiva. Las proporciones óptimas para la eficiencia del K2, eficiencia de KNR2 y eficiencia de Superfect se seleccionan basadas en las recomendaciones del fabricante y antes en experimentos in Vitro para determinar la máxima eficiencia. La dosis de terapéutico-nucleótido se estandariza a través de todos los grupos para volumen total y pH final de la composición para ser administrada tópicamente. Las muestras se preparan como sigue:

Grupo etiquetado AK1: 8 microgramos de plásmido β gal (p/CMV-sport- β gal) por alícuota final (es decir 80 microgramos total) y portador peptidilo KNR2 en un índice de carga de 4:1 se mezclan hasta homogeneidad y se diluye a 200 microlitros con salina amortiguada por fosfato. La composición resultante se mezcla hasta homogeneidad con 1.8 ml de humectante Cetafil y se divide en porciones de 200 microlitros para experimentos en vivo.

Grupo etiquetado AL1: 8 microgramos de plásmido β gal (p/CMV-sport- β gal) por alícuota final (es decir 80 microgramos total) y K2 en un índice de carga de 4:1 se mezclan hasta homogeneidad y se diluyen a 200 microlitros con salina amortiguada de fosfato. La composición resultante se mezcla hasta homogeneidad con 1.8 ml de Cetafil y se divide en porciones 200 microlitros para experimentos en vivo.

Grupo etiquetado AM1: 8 microgramos de plásmido β gal (p/CMV-sport- β gal) por alícuota final (es decir 80 microgramos total) y Superfect en un Índice de carga de 5:1 se mezcla hasta homogeneidad y se diluye a 200 microlitros con salina amortiguada por fosfato. La composición resultante se mezcla hasta homogeneidad con 1.8 ml de Cetafil y se divide en porciones de 200 microlitros para experimentos en vivo.

Experimentos animales para determinar la eficiencia del suministro transdérmico después del tratamiento único con portadores peptídico y terapéuticos-nucleótido:

[0135] Se anestesian animales por vía de inhalación de isoflurano durante la aplicación de los tratamientos. Después de ser anestesiados, 6 ratones negros C57 (n=4 por grupo) se midieron dosis de 200 microlitros del tratamiento apropiado aplicado a la porción craneal de la piel dorsal (seleccionada debido a que el ratón no puede alcanzar esta región con la boca o los miembros). Los animales no experimentaron tratamiento depilatorio. Los animales se recuperaron en un ambiente de calor controlado para evitar hipotermia y se suministra alimento y agua una vez ad limitum durante la noche. Veinticuatro horas post tratamiento, se les practica eutanasia por vía de inhalación de CO₂, y se tratan los segmentos de piel que se cosechan en espesor completo por observadores segados. Los segmentos tratados se dividen en tres porciones iguales, la porción craneal, se fija en 10% de formalina amortiguada neutral durante 12-16 horas luego se almacena en 70% de etanol hasta que se enrede en parafina. La porción central se congela y se emplea directamente para tefido por beta-galactosidasa a 37 grados Celsius en las secciones como se describió previamente (Waugh, J.M., M. Kattash, J. Li,

E. Yuksel, M.D. Kuo, M. Lussier, A.B. Weinfeld, R. Saxena, E.D. Rabinovsky, S. Thung, S.L.C. Woo, and S.M. Shenaq. Local Overexpression of Tissue Plasminogen Activator to Prevent Arterial Thrombosis in an in vivo Rabbit Model. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 96(3): 1065-1070. Also: Elkins CJ, Waugh JM, Amabile PG, Minamiguchi H, Uy M, Sugimoto K, Do YS, Ganaha F, Razavi MK, Dake MD. Development of a platform to evaluate and limit in-stent restenosis. Tissue Engineering 2002. Jun; 8(3): 395-407). El segmento de caudal tratado se congela para estudios de solubilización.

Toxicidad:

[0136] Se evalúa la toxicidad por exclusión de tintes en secciones pareadas a aquellas analizadas para eficiencia anteriores. Las secciones solo experimentan tinte para eficiencia o para toxicidad en razón a los métodos que no son confiables co-empleados. Para el análisis de toxicidad, se sumergen las secciones en tinte de exclusión durante 5 minutos, luego se incuban a 37 grados Celsius para 30 minutos a 10% de CO₂. Cualquier célula que no excluye el tinte en el periodo de tiempo se considera no-viable.

Manejo de datos y análisis estadístico:

[0137] los análisis de recolección de datos e imágenes se desarrollan por observadores cegados. Las secciones teñidas como se hizo anteriormente se fotografían en su totalidad en un microscopio Nikon E600 con lentes planos apochromat. Las imágenes resultantes utilizan procesamiento de análisis de Imagen de tanda utilizando software Image Pro Plus como se hizo anteriormente con confirmación manual para determinar el número positivo para actividad de

enzima de beta-galactosidasa (azul con el método de sustrato empleado aquí) o toxicidad celular. Estos resultados se normalizan para en número total de sección cruzada de células por tefido de rojo nuclear fast para cada uno y tabulada como porcentaje de tefido positivo de sección cruzada. Posteriormente, la media y el error estándar se determinan para cada grupo con análisis de significancia en 95% de confianza una medición de ANOVA repetida de una vía utilizando software Statview (Abacus, Berkeley, CA).

Resultados:

[0138] Los resultados se resumen en la tabla adelante y se ilustran en la Figura 3. El portador de suministro transdérmico de peptidilo cargado positivamente alcanza incrementos significativos estadísticamente en la eficiencia de suministro y expresión de transgen versus K2 (esencialmente control negativo) y el estándar para eficiencia benchmark, Superfect. Mientras que el Superfect alcanzó mejoras estadísticamente significativas sobre el K2, KNR2 tuvo más que un orden de magnitud mejorado en la eficiencia de suministro versus Superfect en este sistema de modelo.

Tabla 1: Media y error estándar para células positivas de beta-galactosidasa como porcentaje del número total por grupo de tratamiento.

Grupo	Media	Error Estándar
AK1	15.00	0.75
AL1	0.03	0.01
AM1	1.24	0.05

P=0.0001 (Significativo en 99%)

[0139] Los resultados para toxicidad se presentan en la Figura 4, que describe el porcentaje de área total que las 24 horas no viables restantes post tratamiento. Aquí, el K2 exhibe toxicidad celular significativa estadísticamente con relación al KNR2 o Superfect, aún en una dosis en donde el K2 tiene baja eficiencia de transferencia como se describió previamente (Amabile, P.G., J.M. Waugh, T. Lewis, C.J. Elkins, T. Janus, M.D. Kuo, and M.D. Dake. Intravascular Ultrasound Enhances in vivo Vascular Gene Delivery. J.Am.Col.Cardiol. 2001 June; 37(7): 1975-80).

Conclusiones:

[0140] El portador transdérmico de peptidilo puede transportar grandes complejos a través de la piel con alta eficiencia, dada particularmente la restricción de expresión del transgen y el tamaño de complejo discutido previamente. El área positiva aquí, a diferencia del número positivo se emplea para análisis (1) el método es grandemente simplificado y tiene mayor exactitud en el análisis de imagen, (2) las demostraciones de punto de eficiencia ya se han producido en II.B concluyentemente, (3) el área de medición suministra un amplio alcance para entender los resultados in vivos en razón a los componentes no celulares que ocupan una porción sustancial de la sección cruzada, y (4) se facilita la comparación con los complejos de portador no peptidilo mayores.

Ejemplo 3

[0141] Este ejemplo ilustra el suministro transdérmico de un terapéutico basado en nucleótido grande a través de la piel utilizando un portador de peptidilio cargado positivamente de la invención en siete aplicaciones diarias secuenciales.

Selección de estructura:

[0142] La estructura de peptidilo cargado positivamente se ensambla al unir covalentemente -Gly₃Arg₇ a polilisina (PM 150,000) por vía del carboxilo de la glicina terminal a las aminas libres de las cadenas laterales de lisina en un grado de saturación de 18% (es decir, 18 fuera de cada 100 residuos de lisina se une covalentemente a un -Gly₃Arg₇). La estructura modificada se designa "KNR2". El policonato de control es polilisina no modificada (designada "K2", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) del mismo tamaño y del mismo lote.

Selección de agentes terapéuticos:

[0143] Para el presente experimento, se emplea un plásmido de 8.5 kilobase (plantilla basada en pSport, Gibco BRL, Gaithersburg, MB) que contiene el transgen completo para el E. Coli beta-galactosidasa (β gal) y secuencias flanqueadoras parciales controladas por un promotor de citomegalovirus (CMV). Este plásmido particular tiene un peso molecular de aproximadamente 2,805,000 y se selecciona así para evaluar el suministro de terapéuticos muy grandes a través de la piel por vía de portadores de peptidilo.

Preparación de las muestras:

[0144] En cada caso, un exceso de policación se emplea para ensamblar el complejo final que tiene un exceso de carga positiva. Proporciones experimentales se seleccionan para hacer un paralelo en los experimentos de dosis única presentados en anteriores experimentos. La dosis terapéutica-nucleótido se estandariza a través de todos los grupos como volumen total y final de pH de la composición para ser aplicada tópicamente. Las muestras se preparan como sigue:

Grupo etiquetado AK1: 8 microgramos de plásmido β gal (p/CMV-sport- β gal) por alícuota final (es decir 240 microgramos total) y el portador peptidilo KnR2 en una proporción de carga de 4:1 se mezcla hasta homogeneidad y se diluyen con 600 microlitros con salina amortiguada por fosfato. La composición resultante se mezcla hasta homogeneidad con 5.4 ml de Cetaphil y se divide en porciones de 200 microlitros para experimentos in vivo para experimentos in vivo.

El grupo etiquetado AL1: 8 microgramos de plásmido β gal (p/CMV-sport- β gal) por alícuota final (es decir 240 microgramos total) y K2 en una proporción de carga de 4:1 se mezcla hasta homogeneidad y se diluyen con 600 microlitros con salina amortiguada por fosfato. La composición resultante se mezcla hasta homogeneidad con 5.4 ml de Cetaphil y se divide en porciones de 200 microlitros para experimentos in vivo para experimentos in vivo.

Experimentos animales para determinar eficiencias de suministro transdérmico acumulativo después de tratamientos de 7 veces diaria con portadores de peptidilo y terapéuticos nucleótido

[0145] Se anestesian animales por vía de inhalación de isoflurano durante la aplicación de los tratamientos. Después de ser anestesiados, 6 ratones negros C57 (n= 4 por grupo) han medido 200 dosis de microlitro del tratamiento apropiado aplicado a la porción craneal de la piel de la espalda (seleccionada debido a que el ratón no puede alcanzar esta región con la boca o los miembros). Los animales no experimentan tratamiento depilatorio. Los animales se recuperan en un ambiente de calor controlado para evitar hipotermia y se suministra alimento y agua ad libitum durante la noche. Este procedimiento se repite una vez diariamente aproximadamente al mismo tiempo del día durante 7 días. Después de 7 días de tratamiento, se práctica eutanasia por vía de inhalación de CO₂, y se cosechan segmentos de piel tratada en espesor completo por observadores cegados. Los segmentos tratados se dividen en tres porciones iguales la porción craneal se fija en 10% de formalina amortiguada durante 12-16 horas luego se almacena en 70% de etanol hasta embeber en parafina. La porción central se congela y se emplea directamente para tñido de β -galactosidasa a 37° Celsius en secciones como se describió previamente. El segmento de caudal tratado se congela para estudios de solubilización.

Manejo de datos y análisis estadístico

[0146] La recolección de datos y análisis de imagen se desarrolla por observadores cegados. Secciones tñidas como se hizo anteriormente se fotografian en su totalidad en un microscopio Nikon E600 con lentes plan-apochromat. Las imágenes resultantes experimentaron procesamiento de análisis de imagen de tanda utilizando software Image Pro Plus como se hizo anteriormente con confirmación manual para determinar área positiva para

actividad de enzima de β -galactosidasa. Estos resultados se normalizan para área de sección cruzada total para cada uno y tabulada como porcentaje de tñido positivo de sección cruzada. Posteriormente, la media y el error estándar se determinan subsecuentemente para cada grupo con análisis de significancia en 95% de confianza en una medición ANOVA repetida de una vía utilizando software Statview (Abacus, Berkeley, CA).

Resultados

[0147] Los resultados se resumen en la Tabla adelante y se ilustran en la Figura 5. El portador de suministro transdérmico de peptidilo alcanza incremento estadísticamente significativo en la eficiencia de suministro y expresión del transgen versus K2.

Tabla 2. La media y el error estándar para expresión de transgen acumulativo de β -galactosidasa como porcentaje del área total después de 7 aplicaciones una vez diaria para cada grupo de tratamiento.

Grupo	Media	Error Estándar
AK	5.004	2.120
AL	0.250	0.060

P= 0.0012 (*significativo en 99%*)

EJEMPLO 4 (portador no peptidillo)

[0148] Este ejemplo ilustra el suministro transdérmico de terapéuticos basados en nucleótidos grandes a través de la piel, utilizando un portador no peptidilo cargado positivamente de la invención en siete aplicaciones secuenciales diariamente.

Selección de estructura:

[0149] La estructura cargada positivamente se ensambla al unir covalentemente -Gly₃Arg₇ a polietilenoimina (PEI) PM 1,000,000 por vía del carboxilo de la glicina terminal para aminos libres de las cadenas laterales PEI en un grado de saturación del 30% (es decir 30 afuera de cada 100 residuos de lisina se unen covalentemente a un -Gly₃Arg₇). La estructura modificada se designa "PEIR" para denotar el portador no peptídico grande. El policatión de control es PEI no modificado (designado "PE1" Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) del mismo tamaño y del mismo lote.

Selección de agente terapéutico:

[0150] Para el presente experimento, un plásmido de 8.5 kilobase (plantilla (pSport-based, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) contiene el transgen completo para E. coli β-galactosidasa (βgal) y secuencias flanqueadoras parciales controladas por promotor de citomegalovirus (CMV) se emplea. Este plásmido particular tiene un peso molecular de aproximadamente 2,805,000.

Preparación de muestras:

[0151] En cada caso, un exceso de policatión se emplea para ensamblar un complejo final que tiene un exceso de carga positiva. La dosis de terapéutico-nucleótido se estandariza a través de todos los grupos como volumen total y final de pH de la composición para ser aplicada tópicamente. Las muestras se preparan como sigue:

Grupo etiquetado AS: 8 microgramos de plásmido β gal (p/CMV-sport- β gal) por alícuota final (es decir 240 microgramos en total) y control PEI en una proporción de carga de 5:1 se mezclan hasta homogeneidad y se diluyen con 600 microlitros con amortiguador Tris-EDTA. La composición resultante se mezcla hasta homogeneidad con 5.4 ml de Cetaphil y se divide en porciones de 200 microlitros para experimentos in vivo.

Grupo etiquetado AT: 8 microgramos de plásmido β gal (p/CMV-sport- β gal) por alícuota final (es decir 240 microgramos total) y portador no peptidilo compuesto "PEIR" en una proporción de carga de 5:1 se mezclan hasta homogeneidad y se diluyen a 600 microlitros con amortiguador Tris-EDTA. La composición resultante se mezcla hasta homogeneidad con 5.4 ml de Cetaphil y se divide en porciones de 200 microlitros para experimentos in vivo.

Grupo etiquetado AU: 8 microgramos de plásmido β gal (p/CMV-sport- β gal) por alícuota final (es decir 240 microgramos en total) y el portador peptidilo altamente purificada Essentia PEIR ("PEIR puro") en una proporción de carga de 5:1 se mezclan hasta homogeneidad y se diluyen a 600 microlitros con amortiguador Tris-EDTA. La composición resultante se mezcla hasta homogeneidad con 5.4 ml de Cetaphil y se divide en porciones de 200 microlitros para experimentos in vivo.

Experimentos animales para determinar las eficiencias de suministro transdérmico acumulado después de 7 tratamientos de una vez diaria con portadores no peptidilos y terapéuticos nucleótido:

[0152] Se anestesian animales por vía de inhalación de isoflurano durante la aplicación de los tratamientos. Después de ser anestesiados, 6 ratones negros C57 (n= 3 por grupo) que tienen dosis medida de 200 microlitros del tratamiento apropiado aplicado a la porción craneal de la piel de la espalda (seleccionada porque los ratones no pueden alcanzar esta región con la boca o los miembros). Los animales no experimentan tratamiento depilatorio. Los animales se recuperan en un ambiente de calor controlado para evitar hipotermia y se suministra una vez alimento y agua ad libitum durante la noche. Este procedimiento se repite una vez diariamente al mismo tiempo aproximado de día durante 7 días. Después de tratamiento de 7 días, se les practica eutanasia a los ratones por vía de inhalación de CO₂, y se cosechan los segmentos de piel tratados en espesor completo por observadores cegados. Los segmentos tratados se dividen en tres porciones iguales, la porción craneal se fija en 10% de formalina amortiguada neutral durante 12-16 horas luego se almacena en 70% de etanol hasta embeber en parafina. La porción central se congela y se emplea directamente para tefido por β -galactosidasa a 37° Celsius en secciones como se describió previamente. El segmento caudal tratado se congela para estudios de solubilización.

Análisis de datos y manejo estadístico:

[0153] La recolección de datos y el análisis de imagen se desarrolla por observadores cegados. Las secciones tefidas como se realizó anteriormente se fotografían en su totalidad en un microscopio Nikon E600 con lentes plan-apochromat. Las imágenes resultantes experimentan procesamiento de análisis de imagen por tanda utilizando Software Image Pro Plus con confirmación manual para determinar área positiva para actividad de enzima de β -galactosidasa. Estos

resultados se normalizan para área de sección cruzada total para cada uno y se tabulan como porcentaje de teñido positivo de sección cruzada. Posteriormente, la media y el error estándar se determinan subsecuentemente para cada grupo con análisis de significancia en 95% de confianza en mediciones ANOVA repetidas de una vía utilizando software Statview (Abacus, Berkeley, CA).

Resultados:

[0154] Los resultados se resumen en la Tabla adelante y se ilustran en la Figura 6. El portador de suministro transdérmico no peptídico –en una forma de compuesto y en una forma ultrapura– alcanzan incrementos estadísticamente significativos en la eficiencia de suministro y expresión de transgen versus PEI. La forma ultrapura del PEIR exhibe tendencia hacia eficiencias mayores que el PEIR estándar consistente con mayor actividad específica calculada del reactivo

Tabla 3. Media y el error estándar para expresión de transgen acumulativo de β -galactosidasa como porcentaje del área total después de 7 aplicaciones una diaria para cada grupo de tratamiento.

Grupo	Media	Error Estándar
AS	0.250	0.164
AT	2.875	0.718
AU	3.500	0.598

P= 0.00058 (significativo en 99%)

Conclusiones:

[0155] El portador transdérmico no peptídico puede transportar complejos grandes a través de la piel con alta eficiencia, particularmente dada las restricciones de expresión de transgen y el tamaño de complejo total discutido previamente. Mientras las eficiencias no son tan grandes como aquellas obtenidas con complejos más pequeños de portadores peptídicos, se acompaña por ganancia significativa. Es de notar, la distribución de expresión de transgen utilizando los complejos no peptídicos grandes que casi exclusivamente se basan en folículo piloso, mientras que los resultados para los portadores peptídicos fueron difusos a través de la sección cruzada. Así, el tropismo de estructura y tamaños se puede emplear para un objetivo nanomecánico de suministro.

Ejemplo 5

[0156] Este experimento demuestra el uso de un portador de peptídico para transportar un complejo grande que contiene una toxina botulínica de proteína etiquetada a través de contacto con la piel después de un tiempo de administración relacionado con controles. La toxina botulínica se escoge aquí como un sistema modelo para proteínas grandes, tal como agentes para inmunización, por ejemplo.

Selección de Estructura:

[0157] La estructura cargada positivamente se ensambla al unir covalentemente -Gly₃Arg₇ a polilisina (PM 112,000) por vía del carboxilo de la glicina terminal a aminas libres de cadenas laterales de lisina en un grado de saturación de 18% (es

decir, 18 fuera de cada 100 residuos lisina se une covalentemente a un -Gly₃Arg₇). La estructura modificada se designa "KNR". El policonjugado de control es polilisina no modificada (designada "K", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) del mismo tamaño y del mismo lote.

Agente terapéutico:

[0158] Se selecciona la marca Botox® de toxina botulinum A (Allergan) para este experimento. Esta tiene un peso molecular de aproximadamente 150,000.

Preparación de muestras:

[0159] La toxina botulinum se reconstituye de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una alícuota de la proteína se biotiniliza con un exceso de molar calculado de 12 veces de biotina sulfo-NHS-LC (Pierce Chemical). El producto etiquetado se designa "Btox-b".

[0160] En cada caso, un exceso de policonjugado se emplea para ensamblar un complejo final que tiene un exceso de carga positiva como en el suministro de complejos de nucleótido grandes altamente negativos. Una carga positiva o neutral neta evita la repulsión del complejo de proteína de proteoglicanos de superficie celular altamente negativa y matriz extracelular. La dosis de Btox-b se estandariza a través de todos los grupos, como volumen total y final de pH de la composición a ser aplicada tópicamente. Se preparan muestras como sigue:

Grupo etiquetado "JMW-7": 2.0 unidades de Btox-b por alícuota (es decir 20 U total) y portador peptídico KNR en una proporción PM calculada de 4: 1 se

mezclan hasta homogeneidad y se diluyen a 200 microlitros con salina amortiguada por fosfato. La composición resultante se mezcla hasta homogeneidad con 1.8 ml de loción Cetaphil® y se divide en porciones de 200 microlitros.

Grupo etiquetado "JMW-8": 2.0 unidades de Btox-b por alcuota (es decir 20 U total) y K en una proporción de carga de 4:1 se mezclan hasta homogeneidad y se diluyen en 200 microlitros con salina amortiguada por fosfato. La composición resultante se mezcla hasta homogeneidad con 1.8 ml de Cetaphil y se divide en porciones de 200 microlitros.

Experimentos animales para determinar la eficiencia de suministro transdérmico después de tratamiento de tiempo único con portadores peptídico y toxina botulinum etiquetada:

[0161] Se anestesian animales por vía de inhalación de isoflurano durante la aplicación de los tratamientos. Después que se anestesian, 6 ratones negros C57 (n= 4 por grupo) experimentan aplicación tópica de dosis medida de 200 microlitros del tratamiento apropiado aplicado a la porción craneal de la piel de la espalda (seleccionada debido a que el ratón no puede alcanzar esta región con la boca o extremidades) los animales no experimentan depilación. A 30 minutos después del tratamiento inicial, se les practica eutanasia a los ratones por inhalación de CO₂ y se cosechan segmentos de piel tratados en espesor completo por observadores cegados. Los segmentos tratados se dividen en tres porciones iguales; la porción craneal se fija en 10% de formalina amortiguada neutral durante 12-16 horas luego se almacena en 70% de etanol hasta embeber en parafina. La porción central se congela y se emplea directamente para visualización de biotina

por observadores cegados como se resume adelante. El segmento caudal tratado se congela para estudios de solubilización.

[0162] La visualización de biotina se conduce como sigue. En resumen, cada sección se sumerge durante 1 hora en solución amortiguadora NeutrAvidin®. Para visualizar actividad de fosfatasa alcalina, se lavan secciones cruzadas en salina cuatro veces luego se sumergen en NBT/BCIP (Pierce Scientific) durante 1 hora. Las secciones se enjuagan en salina y se fotografían en su totalidad en un microscopio Nikon E600 con lentes plan-apocromat.

Manejo de datos y análisis estadístico:

[0163] Se determina el tñido positivo total por observadores cegados vía de análisis de imagen por tandas utilizando software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) y se normaliza para un área de sección cruzada total para determinar el porcentaje de tñido positivo para cada uno. La media y el error estándar se determinan posteriormente para cada grupo con análisis de significancia en 95% de confianza en mediciones ANOVA repetida de una vía utilizando el software Statview (Abacus, Berkeley, CA).

Resultados:

[0164] El área de sección cruzada media positiva para la toxina botulinum biotinilada se reporta como porcentaje del área total después de administración tópica de única de Btox-b con KNR ("EB-Btox") o K ("nl"). Los resultados se presentan en la siguiente Tabla y se ilustran en la Figura 7. En la Figura 7, el área positiva para etiqueta se determina como porcentaje del área total después de 3

días de tratamiento una vez diaria con "EB-Btox" que contienen Btox-b y portador peptidilo KNR y "nl" que contiene Btox-B con policación K como un control. Se describe la media y el error estándar para cada grupo.

Tabla 4. La media y el error estándar para áreas de toxina botulinum etiquetada como porcentaje de la sección cruzada total después de administración tópica de tiempo únicoo de Btox-b con KNR (JMW-7) o K (JMW-8) durante 30 minutos.

Grupo	Media	Error Estándar
JMW-7	33.000	5.334
JMW-8	8.667	0.334

P= 0.0001 (significativo en 99%)

Ejemplo 6

[0165] El ejemplo 5 demuestra que el portador transdérmico de peptidilo permitió la transferencia eficiente de toxina botulinum después de administración tópica en un modelo de murino de contacto con la piel. Sin embargo, este experimento no indica si la toxina botulinum de proteína compleja se libera en una forma funcional después de translocación a través de la piel. El siguiente experimento se construye así para evaluar si la toxina botulinum se puede suministrar terapéuticamente a través de contacto con la piel como un agente tópico que utiliza este portador peptidilo (de nuevo, sin modificación covalente de proteína).

[0166] La estructura cargada positivamente se ensambla de nuevo al unir covalentemente -Gly₃Arg₇ a polilisina (PM 112,000) por vía del carboxilo de la

glicina terminal a aminas libres de las cadenas laterales de lisina en un grado de saturación de 18% (es decir, 18 fuera de cada 100 residuos de lisina se une covalentemente a un -Gly₃Arg₇). La estructura modificada se designa "KNR". El policonado de control es polilisina no modificada (designado "K", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) del mismo tamaño y del mismo lote. El mismo agente terapéutico de toxina botulinum se utiliza como en el Ejemplo 5, y se prepara de la misma forma. Se preparan muestras como sigue:

Grupo etiquetado "JMW-9": 2.0 unidades de toxina botulinum por alícuota (es decir 60 U total) y portador peptídico KNR en una proporción PM calculada de 4:1 se mezclan hasta homogeneidad y se diluyen a 600 microlitros con salina amortiguada con fosfato. La composición resultante se mezcla hasta homogeneidad con 5.4 ml de Cetaphil y se divide en porciones de 200 microlitros.

Grupo etiquetado "JMW-10": 2.0 unidades de toxina botulinum por alícuota (es decir 60 U total) y K en una proporción de carga de 4:1 se mezclan hasta homogeneidad y se diluyen a 600 microlitros con salina amortiguada por fosfato. La composición resultante se mezcla hasta homogeneidad con 5.4 ml de Cetaphil y se divide en porciones de 200 microlitros.

Grupo etiquetado "JMW-11": 2.0 unidades de toxina botulinum por alícuota (es decir 60 U total) sin policonado se diluye a 600 microlitros con salina amortiguada por fosfato. La composición resultante se mezcla hasta homogeneidad con 5.4 ml de Cetaphil y se divide en porciones de 200 microlitros.

**Experimentos animales para determinar la eficacia terapéutica después
tratamiento de tiempo único con portadores peptídico y toxina botulinum:**

[0167] Se anestesian animales por vía de inhalación de isoflurano durante la aplicación de los tratamientos. Después que se anestesian, 6 ratones negros C57 (n= 4 por grupo) experimentan aplicación tópica de dosis medida de 400 microlitros del tratamiento apropiado aplicado uniformemente desde los dedos de las patas a la pierna. Se tratan ambos miembros, y los tratamientos se aleatorizan para cualquier lado. Los animales no experimentan depilación. A 30 minutos después del tratamiento inicial, se evalúan los ratones para capacidad de abducción digital de acuerdo con las calificaciones de abducción digital publicadas para movilidad de pata después de administración de toxina botulinum (Aoki, KR. A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice. Toxicon. 2001 Dec; 39(12): 1815-20). También se evalúa subjetivamente la movilidad del ratón.

Manejo de datos y análisis estadístico:

[0168] La calificación de abducción digital se tabula independientemente por dos observadores cegados. Se determinan posteriormente la media y el error estándar para cada grupo con análisis de significancia en 95% de confianza en menciones ANOVA repetida de una vía utilizando software Statview (Abacus, Berkeley, CA).

Resultados:

[0169] Las calificaciones de abducción digital media después de administración tópica en tiempo sencillo de toxina botulinum con KNR ("JMW-9"), K ("JM-10") o

diluyente sin policación ("JMW-H"), se presenta en la tabla adelante y se ilustran en la fotomicrografia representativa de la Figura 8. El portador de peptidilo KNR produjo suministro funcional significativo estadísticamente de la toxina botulinum a través de la piel con relación a ambos controles, que fueron comparables el uno al otro. Repeticiones independientes adicionales (total de tres experimentos independientes todos con conclusiones idénticas en parálisis significativa estadísticamente de toxina botulinum tópica con KNR pero sinn controles) del presente experimento confirmó los actúales hallazgos y revela que no hay diferencias significativas entre la toxina botulinum con o sin K (es decir ambos controles). De forma interesante, los ratones de ambularon consistentemente hacia un extremo paralizado (que ocurre en el 100% de los animales tratados y 0% de controles de cualquier grupo de control). Como se muestra en la Figura 8, un miembro tratado con toxina botulinum más la polilisina policación de control o con la toxina botulinum sin policación ("solo Botox") puede movilizar los dedos (como un mecanismo de defensa cuando se recoge), pero los miembros tratados con toxina botulinum más el portador de peptidilo KNR ("Essentia Botox lotion") no se puede mover.

Tabla 5. Calificaciones de abducción digital 30 minutos después de aplicación tópica de tiempo único de toxina botulinum con el portador de peptidilo de KNR ("JMW-9") con un policación de control K ("JMW-10"), o solo ("JMW-11").

Grupo	Media	Error Estándar
JMW-9	3.333	0.333
JMW-10	0.333	0.333
JMW-11	0.793	0.300

P= 0.0351 (significativo al 95%)

Conclusiones:

[0170] Este experimento sirve para demostrar que el portador transdérmico de peptidilo puede transportar una cantidad terapéuticamente efectiva de terapéutico botulinum a través de la piel sin modificación covalente del terapéutico. El experimento también confirma que la toxina botulinum no funciona cuando se aplica tópicamente en controles.

Ejemplo 7

[0171] Este experimento demuestra el desempeño de un portador no peptidilo en la invención.

Selección de estructura:

[0172] La estructura cargada positivamente se ensambla al unir covalentemente - Gly₃Arg₇ a polietilenoimina (PEI) PM 1,000,000 por vía del carboxilo de la glicina terminal para aminos libres de las cadenas laterales PEI en un grado de saturación de 30% (es decir 30 fuera de cada 100 residuos de lisina se une covalentemente a un Gly₃Arg₇). La estructura modificada se designa "PEIR" para denotar el portador no peptidilo grande. El polímero de control es PEI no modificado (designado "PE1" Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) del mismo tamaño y del mismo lote. El mismo agente terapéutico de toxina botulinum se utiliza como en el Ejemplo 5.

[0173] La toxina botulinum se reconstituye del producto Botox® de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En cada caso, un exceso de polimerización se emplea para ensamblar un complejo final que tiene un exceso de carga positiva como en el suministro de complejos de nucleótidos grandes altamente negativos. Una carga neta positiva o neutra evita la repulsión del complejo de proteína de los proteoglicanos de superficie celular altamente negativa y matriz extracelular. La dosis de toxina botulinum se estandariza a través de todos los grupos como volumen total y final de pH de la composición a ser aplicada tópicamente. Las muestras se preparan como sigue:

Grupo etiquetado "AZ": 2.0 unidades de toxina botulinum por alícuota (es decir 60 U total) y el portador no peptídico PEIR en forma ultrapura en una proporción de PM calculada de 5:1 se mezclan hasta homogeneidad y se diluyen a 600 microlitros con salina amortiguada por fosfato. La composición resultante se mezcla hasta homogeneidad con 5.4 ml de Cetaphil y se divide en porciones de 200 microlitros.

Grupo etiquetado "BA": 2.0 unidades de toxina botulinum por alícuota (es decir 60 U total) y PEI en una proporción de carga de 5:1 se mezclan hasta homogeneidad y se diluyen a 600 microlitros con salina amortiguada por fosfato. La composición resultante se mezcla hasta homogeneidad con 5.4 ml de Cetaphil y se divide en porciones de 200 microlitros.

Experimentos animales para determinar la eficacia terapéutica después
tratamiento de tiempo único:

[0174] Se anestesian animales por vía de inhalación de isoflurano durante la aplicación de los tratamientos. Después se anestesian, 6 ratones negros C57 (n= 3 por grupo) que experimentan aplicación tópica de dosis medida de 400 microlitros del tratamiento apropiado aplicado uniformemente desde los dedos de las patas a la pierna. Se tratan ambas extremidades, y los tratamientos se aleatorizan para cualquier lado. Los animales no experimentan depilación. A 30 minutos después del tratamiento inicial, se evalúan los ratones para capacidad de abducción digital de acuerdo con las calificaciones de abducción digital publicadas para movilidad de pata después de administración de toxina botulinum (Aoki, KR. A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice. *Toxicon*. 2001 Dec; 39(12): 1815-20). Se evalúa la movilidad de los ratones subjetivamente.

Manejo de datos y análisis estadístico:

[0175] La clasificación de abducción digital se tabula independientemente por dos observadores cegados. La media y el error estándar se determinan posteriormente para cada grupo con análisis de significancia en 95% de confianza en mediciones ANOVA repetidas de una vía utilizando software Statview (Abacus, Berkeley, CA).

Resultados:

[0176] La calificación de abducción digital media después de administración tópica de tiempo sencillo de toxina botulinum con PEIR ultrapuro ("AZ"), o aplicación PEI de control ("BA"), y repetición (repetición independiente única para este experimento se presenta en las Tablas adelante). El portador PEIR no

peptidilo produjo suministro funcional estadísticamente significativo de toxina botulinum a través de la piel con relación a los controles. Como se hizo anteriormente, se observó a los animales caminar en círculos hacia los miembros paralizados.

Tabla 6.Repetición 1. Calificación de abducción digital 30 minutos después de administración tópica de tiempo único con toxina botulinum con PEIR ultrapuro ("AZ"), o PEI de policación de control ("BA"). Se presenta la media y el error estándar.

Grupo	Media	Error Estándar
BA	0,833	0,307
AZ	3,917	0,038

P= 0.0002 (significativo en 99%)

Tabla 7. Calificación de abducción digital 30 minutos después de administración tópica de tiempo único de toxina botulinum con PEIR ultrapuro ("AZ1"), o policación PEI de control ("BA1"). Se presentan media y el error estándar.

Grupo	Media	Error Estándar
BA1	0.333	0.211
AZ1	3.833	0.167

P= 0.0001 (significativo en 99%)

Conclusiones:

[0177] Este experimento demuestra que el portador transdérmico no peptidilo puede transportar dosis terapéuticas de toxina botulinum a través de la piel sin

modificación anterior covalente de la toxina botulinum. Estos hallazgos complementan aquellos con los agentes de transferencia de peptidilo. La opción de utilizar un portador no peptidilo o un portador peptidilo para lograr el efecto terapéutico permitirá la adaptación a circunstancias específicas, ambientes y métodos de aplicación y agregar al ancho de la plataforma de suministro transdérmico de esta invención.

[0178] En estos ejemplos la penetración de la toxina botulinum con los portadores no peptidilo o peptidilo versus la toxina botulinum tópica sin el portador establece adicionalmente la utilidad para la penetración transdérmica de antígenos para inmunización, particularmente para inmunización con agentes que cruzan pobremente la piel de otra forma como el botulinum. El suministro de una toxina botulinum funcional asegura que al menos cuatro epítopos distintos se han suministrado transdérmicamente en estado de contacto, el hecho de que la toxina botulinum funcional no se suministra en la ausencia del portador en cualquier ejemplo confirma que el portador produce inmunización significativa potencial relacionada con el agente en la ausencia del portador. En razón a que la inmunización requiere que el antígeno cruce la piel en una cantidad suficiente para montar una respuesta inmune, esta aproximación permite el suministro transdérmico de un antígeno para inmunización. Debido a que esta aproximación no requiere modificación covalente del antígeno y necesita no involucrar transferencia de gen viral, un número de ventajas se presenta en términos de estabilidad de seguridad y eficiencia.

Ejemplo 8

[0179] Este experimento detalla la producción de portadores peptídico y no peptídico con factores de eficiencia TAT, así como también el ensamble de estos portadores con toxinas botulinum.

Acoplamiento de polietileno imina (PEI) de fragmento TAT GGGRKKRRQRRR:

[0180] Al fragmento TAT GGGRKKRRQRRR (6mg, 0.004 mmol, Sigma Genosys, Houston, TX), que le falta todos los grupos de cadena lateral, se disuelve en 1 ml de 0.1 M de amortiguador MES a este se agrega EDC (3 mg, 0.016 mmol) seguido por PEI de peso molecular 400k 50% de solución (p:v) en agua, (~0.02 ml, ~2.5 x 10⁻⁵ mmol) el pH se determina para ser 7.5 por papel de ensayo. Otra porción de 1 ml de 0.1 M de MES y el pH se ajusta a ~5 por adición de HCl. Otra porción de EDC (5 mg, 0.026 mmol) se agrega y la reacción, pH ~5 se agita durante la noche. La siguiente mañana la mezcla de reacción se congela y se liofiliza.

[0181] Una columna (1 cm de diámetro x 14 cm de alto) de Sephadex G-25 (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) se prepara en lechada en PBS 1x estéril. La columna se estandariza por elusión de dextranos FITC (Sigma, St Louis, MO) que tiene un peso molecular de 19 kD. El estándar eluido inicialmente en 5 ml PBS, tiene pico medio en 6 ml y de cola en 7 ml. La mezcla de reacción liofilizada anterior se disuelve en PBS de volumen pequeño y se aplica a la columna. Esta se eluye por aplicaciones sucesivas de 1 ml de PBS. Las fracciones se recolectan con el primero que consiste del primer 3 ml eluido, que incluye el volumen de reacción. Las fracciones posteriores fueron de 1 ml.

[0182] Las fracciones eluidas se ensayan para absorbancia de UV a 280 nm. Fracciones 3, 4 y 5 que corresponden a 5-7 ml definen un pico de absorbancia

modesto. Todas las fracciones se liofilizan y se toma espectro IR. El pico típico de guanidina característico ($2800-3000\text{ cm}^{-1}$) del fragmento TAT se ve en la fracciones 4-6. estas fracciones también muestran una tensión amida en 1700 cm^{-1} confirmando así el conjugado del fragmento TAT y PEI.

[0183] Otra iteración se corre utilizando el fragmento TAT GGGRKKRRQRRR (11.6 mg, 0.007 mmol). Esta cantidad de tal forma que 1 en 30 de las aminas PEI se esperaba que reaccionen con el fragmento TAT. Esto aproxima la composición del factor de eficiencia (KNR) polilisina-oligoarginina original descrito anteriormente. La unión covalente exitosa del fragmento TAT a las aminas PEI se confirma por IR como se hizo anteriormente.

Acoplamiento de polilisina al fragmento TAT:

[0184] A una solución de polilisina (10 mg 1.1×10^{-4} mmol; Sigma) en 1 ml de 0.1M MES, pH ~ 4.5 se agrega el fragmento TAT (4 mg, 0.003 mmol) luego EDC (3.5 mg, 0.0183 mmol). La mezcla de reacción resultante (~4.5) se agita a temperatura ambiente. La reacción se congela a -78°C durante la noche. Al siguiente día la mezcla de reacción se descongela a temperatura ambiente y el pH se ajusta a -8 por la adición de bicarbonato de sodio saturado. La mezcla de reacción se aplica directamente a una columna Sephadex G-25 constituida y estandarizada como se describió anteriormente. Esta se eluye en 7 fracciones de 1 ml partiendo después de 5 ml. Se toma la absorbancia UV 280, revelando un pico relativo en fracción 2, 3 y 4. El IR de las fracciones liofilizadas revela el pico de guanidina característico ($2800-3000\text{ cm}^{-1}$) en fracciones 1-7. La fracción tiene un pico fuerte en 1730^{-1} y ninguno en 1600 cm^{-1} , pero para fracciones 2-6 el

opuesto fue real. Así, la unión covalente exitosa del fragmento TAT a un portador peptídico, polilisina, se confirma.

[0185] El fragmento TAT y el PEI (PEIT) y fragmento TAT unido covalentemente y la polilisina (KNT) se mezclan posteriormente con toxina botulinum para formar un complejo no covalente como se hizo anteriormente:

Grupo etiquetado "JL-1": 2.0 unidades de Btox-b por alícuota (es decir 20 U total) y PEIT en una proporción de carga de 4:1 se mezclan hasta homogeneidad y se diluyen a 200 microlitros con salina amortiguada por fosfato.

Grupo etiquetado "JL-2": 2.0 unidades de Btox-b por alícuota (es decir 20 U total) y Unten una proporción de carga de 4:1 se mezclan hasta homogeneidad y se diluyen a 200 microlitros con salina amortiguada por fosfato.

[0186] Después de la formación de complejo no covalente, las partículas se centrifugan a 12,000 x g en una centrífuga rotatoria durante 5 minutos, luego se resuspenden en 20 microlitros de agua desionizada y se evaporan en una célula de reflectancia total atenuada de Germanio para IR. La presencia del Btox-b en los complejos se confirma así. De forma general, este experimento confirma que los esquemas sintéticos se pueden aplicar a otros factores de eficiencia y los portadores resultante pueden ser complejados con un agente biológicamente activo –en este caso toxina botulinum- como en los ejemplos anteriores utilizando portadores con grupos ramificados eficientes cargados positivamente con oligoarginina.

Ejemplo 9

[0187] Este experimento demuestra el desempeño de un portador de peptidilo para la formación de imágenes de un antígeno específico. En este ejemplo, los complejos de una de los portadores de peptidilo Essentia, KnR2, composiciones formadores de imagen óptica y anticuerpos modificados que objetivan melanoma son adecuados para detección tópica de melanoma.

Selección de estructura:

[0188] La estructura de peptidilo cargada positivamente se ensambla por unión covalente del - Gly₃Arg₇ a polilisina (PM 150,000) por vía del carboxilo del terminal glicina de aminas libres de las cadenas laterales lisina en un grado de saturación de 18% (es decir, 18 fuera de cada 100 residuos de lisina se unen covalentemente a un -Gly₃Arg₇). La estructura modificada se designa "KNR2". El policatión de control fue polilisina no modificada (designada "K", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) del mismo tamaño y del mismo lote.

[0189] Un anticuerpo monoclonal de murina para un dominio de melanoma humano conservado, gangliosida 2, (IgG3, US Biologicals, Swampscott, MA) se une covalentemente a una cadena de anión de poliaspartato corta (PM 3,000) por vía de acoplamiento EDC como se anteriormente para generar un anticuerpo derivado designado "Gang2Asp". Adicionalmente, el agente formador de imagen aniónico se designa utilizando un oligonucleótido como un polianión en donde la secuencia es ATGC-J (designada "ATGC-J" en adelante) con "J" que representa un fluoróforo Rojo Texas unido covalentemente (Sigma Genosys, Woodlands, TX).

Para este experimento, 6.35 microgramos de Gang2Asp se combinan con 0.1712 microgramos de ATGC-J y luego se compleja con 17.5 microgramos de KNR2 en un volumen total de 200 microlitros de agua desionizada para lograr una proporción final 5:1:1::KNR2:ATGC-J:Gang2Asp. La mezcla se centrifuga durante 2 minutos. Los complejos resultantes se aplican para hidratar Tajadas de Melanoma Humano CellTek y Tajadas de Citoqueratina CellTek de control (SDL, Des Plaines, IL) e incubadas durante 5 minutos antes de evaluación fotográfica de distribución de fluorescencia versus distribución de campo claro de pigmento de melanoma en el mismo campo. También se emplean controles adicionales sin ATGC-J o sin Gang2Asp.

Resultados:

[0190] Los complejos no covalentes producen una distribución del agente formador óptico que sirve al tropismo del anticuerpo derivado de forma diferente de la distribución de los complejos en la ausencia del anticuerpo. Más aun, los complejos siguen una distribución que caza con las células de melanoma pigmentadas como se describe en la Figura 9.

Conclusiones:

[0191] Este experimento demuestra la producción de un complejo viable para transportar a través de la piel y la visualización del melanoma a través de técnicas ópticas que utilizan un portador adecuado para suministro tópico. Tal una aproximación se puede emplear por ejemplo en conjunto con configuración de margen quirúrgico o se puede emplear en rutina de vigilancia de melanoma. Estrategias similares se pueden emplear fácilmente para el diagnóstico tópico de

otros desordenes relacionados con la piel también, así como será evidente para un experto en la técnica. Dada la muy alta sensibilidad de las porciones formadoras de imagen óptica, la promesa significativa en la detección mejorada de estos desordenes se puede producir a través de estos complejos no covalentes.

Ejemplo 10

[0192] este experimento demuestra la eficiencia y profundidad de penetración de n portador de peptidilo en el suministro transdérmico de una mezcla de proteínas de tamaño y estructura diferentes.

Métodos:

[0193] Proteínas Revitix [Organogenesis, Canton, MA] se biotinilan y almacenan a 4° Celsius. La concentración de proteínas Revitix biotiniladas utilizadas fue 10-15 ng/μl. El artículo de ensayo y los controles comparativos en este estudio se muestran en la Tabla 1. Este estudio tiene dos controles, uno con agua dionizada de pH que casa con el Revitix y el otro con Revitix por sí mismo. El artículo de ensayo para el grupo de tratamiento fue el Revitix con portador de peptidilo.

Tabla 8: Descripción del artículo de ensayo y controles comparativos.

Grupos	Artículo de ensayo y controles comparativos	Punto de tiempo de estudio
A	Agua, pH 7.0	2 días
B	Sólo Revitix	2 días
C	Revitix + portador	2 días

D	Agua, pH 7.0	9 días
E	Sólo Revitix	9 días
F	Revitix + portador	9 días

Experimentos animales para determinar eficiencia de suministros transdérmico acumulado después de 2 y 9 tratamiento de una vez al día con portadores de peptidilo y proteínas Revitix:

[0194] 6 ratones hembra negros C57 (n=5 por grupo) se anestesian por vía de inhalación de isoflurano y luego se inyectan con 0.05 ml de cocktail anestésico para roedor (3.75 ml de 100 mg/ml Cetamina, 3.00 ml de 20 mg/ml Xilazina, y 23.25 ml de salina) intraperitonealmente. Después se anestesia cada ratón a 2.0 cm x 2.0 cm de sitio de dosis en el dorso de cada ratón se afeita cuidadosamente con una tijera para cabello (Oster) dos días antes del primer día de aplicación de tratamiento. Los animales no experimentaron tratamiento depilatorio adicional. Los animales se anestesiaron por vía de inhalación de isoflurano solo durante la aplicación del tratamiento en crema humectante Cetafil (Galderma, Fort Worth, TX) y tiene dosis de 200 microlitros medidas del tratamiento apropiado aplicado a la porción craneal de la piel de la espalda (seleccionada debido a que el ratón no puede alcanzar esta región con la boca o los miembros). Los animales permanecieron bajo anestesia durante 2-5 minutos mientras el tratamiento apropiado se aplicó en la piel con los dedos cubiertos. Los animales se recuperaron en un ambiente de calor controlado para evitar hipotermia y se suministra comida y agua una vez ad limitum durante la noche. Este procedimiento se repite una vez diariamente al mismo tiempo aproximado de día durante 2 y 9 días. Después de 2 y 9 días de tratamiento, se les practica eutanasia a los ratones por vía de inhalación de CO₂, y los segmentos de piel tratados se cosechan en espesor completo por observadores segados a 8 horas post aplicación del último

tratamiento. Los segmentos tratados se dividen en tres porciones iguales. La porción craneal se fija en 10% de formalina amortiguada neutral durante 12-16 horas, luego se almacena en 70% de etanol hasta que se embebe en parafina. La porción central se emplea para NeutrAvidin, Hematoxylin & Eosin, y tñido específico por Cloroesterasa. Los segmentos caudales tratados se congelan para estudio de solubilización.

Manejo de datos y análisis estadístico:

[0195] La recolección de datos y el análisis de imagen se desarrollan por observadores segados. Las secciones tñidas se fotografían con cámara Retiga 1300B (QImaging, Burnaby, BC, Canada) sobre un microscopio Nikon E600 con lente plan-apocromat. El tñido positivo se determina por un observador segado utilizando software análisis Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Springs, MD) con extracción de canal verde y umbral, y expresado como píxeles positivos. Se determina posteriormente análisis estadístico para cada grupo utilizando software Statview® (Abacus Concepts, Berkeley, CA) y expresado como media y error estándar. La significancia estadística para toda la comparación se determinó utilizando mediciones de un factor ANOVA repetido y ensayo Fisher PLSD post-hoc a 95% de confianza.

Resultados:

[0196] Las proteínas Revitix se etiquetan con biotina y se muestra buen etiquetado sobre la variedad de proteínas. Se utiliza tñido NeutrAvidin para determinar el suministro transdérmico de la proteína Revitix. Las fotografías del grupo de control (panel a y c y e) versus grupo de tratamiento (b y d y f) en dos

magnificaciones diferentes se muestran la Figura 10, en donde a y b están en magnificación 10X y c a través de f están en magnificación 20X. La media para tñido NeutrAvidin positivo se utiliza para comparación. La media de tñido positivo para Revitix más estructura fue significativamente mayor que el agua en el día 3 (50.297 ± 6.394 vs. 16.676 ± 2.749) y Revitix sólo (50.297 ± 6.394 vs. 18.379 ± 6.394 ; $P = 0.0041$).

Tabla 9: Tñido por NeutraAvidin positivo. Se presenta media y error estándar.

Grupo	Media	Error estándar
A	16.676	2.749
B	18.379	6.394
C	50.297	6.394

$P=0.0041$ (Significativo en 95%)

Conclusión:

[0197] El análisis de gel de proteínas biotin-etiquetadas permite la confirmación de la etiqueta in vitro.

[0198] Se utiliza punto de tiempo de dos días para determinar el flujo. Este experimento confirma un incremento significativo estadísticamente en el suministro transdérmico de proteínas etiquetadas versus ambos grupos de control. La profundidad y cantidad de señal incrementada marcadamente en el grupo portador versus grupo de control. De forma interesante una población diversa de proteínas se transporta a través de la piel con estas partículas preensambladas como se verifica por electroforesis de gel y evaluaciones espaciales de tropismos.

Ejemplo 11

[0199] Estos experimentos demuestran una plataforma formadora de imagen molecular capaz de suministro transepitelial objetiva de sondas fluorescentes por uso de portador de peptidilo y anticuerpos de antígeno de tumor.

Estructura:

[0200] La estructura de peptidilo cargada positivamente se ensambla por unión covalente-Arg₉ a polilisina (PM 150,000) por vía del carboxilo de la glicina terminal a aminas libres de las cadenas laterales de lisina en un grado de saturación del 18% (es decir, 18 fuera de cada 100 residuos de lisina se unen covalentemente a un -Arg₉). La estructura modificada se designa "KNR". El policatión de control fue polilisina no modificada (designada "K", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) del mismo tamaño y del mismo lote.

Métodos:

Diseño de sonda:

[0201] La sonda es un sistema multicomponente que se autoensambla basado en interacciones electrostáticas. Tal un sistema permite la fase en sustitución de porciones funcionales. El componente central es una estructura portadora que tiene un exceso de cargas positivas y múltiples CPP adheridos. Todas las cargas son negativas. El complejo final tiene una carga neta positiva para mantener la actividad de transporte.

Toxicidad de portado in vitro:

[0202] La siguiente estructura de portados se ensaya para toxicidad:

1. KNR

2. Poli-L-lisina sin cadenas laterales R9 (K)

3. Superfect (Qiagen, Valencia, CA), un agente de transfección comercial de células HeLa (ATCC, Manassas, VA) crecen en 70% de confluencia, se incuban con 0.4 mg de portadores (n=6 pozos/grupo) en suero libre de medio durante 2 horas y luego se lava con PBS. Se ensaya la toxicidad utilizando un ensayo de exclusión de tinte estándar en donde las células viables excluyen tinte mientras que las células viables no lo hacen. La toma de tinte se mide utilizando un espectrofotómetro (Spectronic Genesys 5 UV/VIS) con longitud de onda de 595 nm. Las muestras estandarizan para número de células al ajustar las concentraciones para cazar valores OD280 antes de las mediciones OD595.

Suministro de gen reportero transdérmico in vivo:

[0203] Para determinar si el portador KNR puede suministrar cargas de peso molecular grandes en la forma de genes reportero bioluminiscentes a través de una barrera de tejido (piel), se ensayan las siguientes sondas con estructuras portadoras que varían:

1. Estructuras: KNR; Controles — K, Superfect, sin portador

2. Cargas y porciones formadoras de imagen: Plásmidos que expresan proteína azul fluorescente (BFP, 8kb, 2.6 millones PM)

Los complejo de plásmido-estructura (8µg plásmido) se forman por vía de interacciones iónicas (estructura catiónica-ADN aniónico) y luego se aplican al dorso de la piel de 6 ratones negros C57 (n=4 por grupo) diario por 7 días. Los segmentos de piel tratado se cosechan luego y la expresión BFP se evalúa por microscopia de fluorescencia. La eficiencia de suministro de gen transdérmico se determina por % de células BFP positivas / total de células en la dermis únicamente.

Suministro objetivado de sondas formadoras de imagen para células de tumor.

[0204] Para determinar si el sistema KNR puede producir suministro objetivado de sondas formadores de imagen ópticas para antígenos de cáncer de colon, se ensayan las siguientes sondas con componentes objetivos que varían:

1. **Estructura:** KNR
2. **Porción de formadora de imagen:** oligonucleótido base 4 (Sigma-Genosys) etiquetado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sondas Moleculares)
3. **Porciones objetivos:** a) anticuerpo monoclonal para antígeno carcinoembrionario (CEA; clon CD66e, US Biológico) conjugado covalentemente para poliaspartato aniónico (3K PM) por vía de acoplamiento EDC; b) Anticuerpo de control – monoclonal para actina (clon 3G1, US Biológico) conjugado a poliaspartato.

Luego de la formación de complejos objetivo formadores de imagen KNR, células de carcinoma de colon humano co-cultivadas (n=6 pozos/grupo) (LS174T, ATCC) que sobreexpresa el CEA y los fibroblastos de ratón de control (3T3, ATCC) se

incubaban con complejos en medio libre de suero durante 2 horas. Las células se lavan posteriormente 3X con PBS. Se evalúa el suministro objetivado por cuantificar porcentaje de células LS174T y células 3T3 etiquetadas con FITC. Las células 3T3 y las células LS174T se identifican por morfología.

Resultados:

[0205] El KNR alcanza mayor eficiencia 20X en suministro transdérmico y expresión de transgen BFP versus control ($5\% \pm 2.125$ vs. $0.25\% \pm 0.06\%$, $P < 0.01$), validar la confiabilidad del suministro tópico de los complejos suficientemente grandes para formación de imagen molecular. En la evaluación del suministro objetivado, las señales TR y de fluoresceína, aunque se piense que cada una es un componente distinto del completo, co-localizado en 40.2% de píxeles de célula de carcinoma de colon (correlación $r = 0.74$, $P < 0.001$). Las células de fibroblastos de control se etiquetan mínimamente con fluoresceína o TR mientras que el $87.6\% \pm 8.3\%$ de células de carcinoma de colon fueron positivas para señal de fluoresceína. La toxicidad relativa para los resultados de estructuras portadoras se muestran en la Figura 11 y los resultados de eficiencia de suministro de gen transdérmico se muestran en la Figura 12.

La imagen de campo claro de carcinoma de colon (C) y co-cultivos de fibroblastos (F, forma de huso) luego de aplicación de sonda formadora de imagen específica CEA (panel a) e imagen de fluorescencia que muestra etiqueta de fluoresceína de carcinoma de colon pero no fibroblastos (panel b) se representan en la Figura 13.

Tabla 10: Suministro transdérmico y expresión de transgen de sonda formadora de imagen. Se presenta media y error estándar en porcentaje.

Grupo	Media	Error estándar
BFP	5%	2.12%
Control	0.25%	0.06%

P<0.01 (Significativo a 99%)

Conclusión:

[0206] Suministro transdérmico de un complejo grande (gen BFP) después de aplicación tópica y suministro objetivado de una sonda óptica con paralelos para distribución de antígenos se demuestran utilizando KNR. Estos estudios confirman la confiabilidad de utilizar este sistema para la vigilancia tópica del melanoma o detección submucosal de cáncer de colon. Como será evidente para un experto en la técnica, esta plataforma se puede utilizar para suministro objetivado de terapéuticos, diagnósticos, o combinaciones de ambos. Adicionalmente, esta plataforma se puede utilizar para formar imágenes en tiempo real por vía de colonoscopia o dematoscopia (o visualización directa) así como también métodos de formación de imagen tal como colonoscopia virtual.

[0207] Se entenderá que los ejemplos y modalidades descritas aquí solo son para propósito ilustrativo y que varias modificaciones o cambios en calidad de esta se sugerirán por personas expertas en la técnica y se incluirán dentro del espíritu y alcance de esta solicitud y de las reivindicaciones adjuntas. Todas las publicaciones, patentes, solicitudes de patentes citadas aquí se incorporan como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

REIVINDICACIONES

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Una composición que comprende una proteína biológicamente activa y un portador que comprende una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente y que están presentes en una cantidad efectiva para suministro transdérmico, en donde la asociación entre el portador y la proteína biológicamente activa no es covalente.
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la cual la proteína terapéutica excluye insulina, toxinas botulinum, VEGF, y fragmentos de anticuerpo.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2 en la cual la proteína terapéutica no altera terapéuticamente los niveles de glucosa en la sangre.
4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2 en la que la proteína terapéutica excluye toxinas botulinum.
5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2 en la que la proteína terapéutica excluye VEGF.
6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2 en la que la proteína terapéutica excluye fragmentos de anticuerpo.

7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la composición provee mayor suministro transdérmico a la proteína biológicamente activa relacionada con el agente en la ausencia del portador.
8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 7 en la que la proteína biológicamente activa tiene actividad terapéutica.
9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8 en la que la proteína terapéutica tiene un peso molecular de menos de 20,000 kD.
10. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la estructura comprende un polipéptido cargado positivamente.
11. Una composición de acuerdo con la reivindicación 10 en la que la estructura comprende un polipéptido cargado positivamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 1,500,000.
12. Una composición de acuerdo con la reivindicación 10 en la que la estructura comprende un polipéptido cargado positivamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 25,000 a aproximadamente 1,200,000.
13. Una composición de acuerdo con la reivindicación 10 en la que la estructura comprende un polipéptido cargado positivamente que tiene

un peso molecular de aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,000,000.

14. Una composición de acuerdo con la reivindicación 10 en la que la estructura comprende una polilisina cargada positivamente.
15. Una composición de acuerdo con la reivindicación 14 en la que la estructura comprende una polilisina cargada positivamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 1,500,000.
16. Una composición de acuerdo con la reivindicación 14 en la que la estructura comprende una polilisina cargada positivamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 25,000 a aproximadamente 1,200,000.
17. Una composición de acuerdo con la reivindicación 14 en la que la estructura comprende una polilisina cargada positivamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,000,000.
18. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la estructura comprende un polímero no peptídico cargado positivamente.
19. Una composición de acuerdo con la reivindicación 18 en la que la estructura del polímero no peptídico comprende una polialquilenimina cargada positivamente.

20. Una composición de acuerdo con la reivindicación 19 en la que la polialquilenimina es una polietilenimina.
21. Una composición de acuerdo con la reivindicación 20 en la que la polietilenimina tiene un peso molecular de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 2,500,000.
22. Una composición de acuerdo con la reivindicación 20 en la que la polietilenimina tiene un peso molecular de aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,800,000.
23. Una composición de acuerdo con la reivindicación 20 en la que la polietilenimina tiene un peso molecular de aproximadamente 500,000 a aproximadamente 1,400,000.
24. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que el portador comprende una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente seleccionados de $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT y fragmentos de estos, y Antennapedia PTD y fragmentos de estos, en la que el subíndice $n1$ es un entero de 0 a aproximadamente 20, y el subíndice $n2$ es independientemente un entero impar de aproximadamente 5 a aproximadamente 25.
25. Una composición de acuerdo con la reivindicación 24 en la cual los grupos ramificados cargados positivamente se seleccionan de los grupos que tienen la fórmula $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$.

26. Una composición de acuerdo con la reivindicación 25 en la que el subíndice n_1 es un entero de aproximadamente 1 a aproximadamente 8.
27. Una composición de acuerdo con la reivindicación 25 en la que el subíndice n_1 es un entero de aproximadamente 2 a aproximadamente 5.
28. Una composición de acuerdo con la reivindicación 25 en la que el subíndice n_2 es un número impar de aproximadamente 7 a aproximadamente 17.
29. Una composición de acuerdo con la reivindicación 25 en la que el subíndice n_2 es un número impar de aproximadamente 7 a aproximadamente 13.
30. Una composición de acuerdo con la reivindicación 24 en la cual los grupos ramificados se seleccionan de HIV-TAT y fragmentos de estos.
31. Una composición de acuerdo con la reivindicación 30 en la cual los grupos ramificados adheridos cargados positivamente son fragmentos HIV TAT que tienen la fórmula $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$, o $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$ en donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un entero de 0 a 20.

32. Una composición de acuerdo con la reivindicación 24 en la cual los grupos ramificados son grupos Antennapedia PTD o fragmentos de estos.
33. Una composición que comprende un agente biológicamente activo no nucleótido no proteína y un portador que comprende una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente y que están presentes en una cantidad efectiva para suministro transdérmico, en donde la asociación entre el portador y el agente biológicamente activo no es covalente.
34. Una composición de acuerdo con la reivindicación 33 en donde la composición provee mayor suministro transdérmico del agente biológicamente activo relativo al agente en la ausencia del portador.
35. Una composición de acuerdo con la reivindicación 34 en la que el agente biológicamente activo tiene una actividad terapéutica.
36. Una composición de acuerdo con la reivindicación 33 en la que la estructura comprende un polipéptido cargado positivamente.
37. Una composición de acuerdo con la reivindicación 36 en la que la estructura comprende un polipéptido cargado positivamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 1,500,000.

38. Una composición de acuerdo con la reivindicación 36 en la que la estructura comprende un polipéptido cargado positivamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 25,000 a aproximadamente 1,200,000.
39. Una composición de acuerdo con la reivindicación 36 en la que la estructura comprende un polipéptido cargado positivamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,000,000.
40. Una composición de acuerdo con la reivindicación 36 en la que la estructura comprende una polilisina cargada positivamente.
41. Una composición de acuerdo con la reivindicación 40 en la que la estructura comprende una polilisina cargada positivamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 1,500,000.
42. Una composición de acuerdo con la reivindicación 40 en la que la estructura comprende una polilisina cargada positivamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 25,000 a aproximadamente 1,200,000.
43. Una composición de acuerdo con la reivindicación 40 en la que la estructura comprende una polilisina cargada positivamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,000,000.

44. Una composición de acuerdo con la reivindicación 33 en la que la estructura comprende un polímero no peptídico cargado positivamente.
45. Una composición de acuerdo con la reivindicación 44 en la que la estructura del polímero no peptídico comprende una polialquilenimina cargada positivamente.
46. Una composición de acuerdo con la reivindicación 45 en la que la polialquilenimina es una polietilenoimina.
47. Una composición de acuerdo con la reivindicación 46 en la que la polietilenoimina tiene un peso molecular de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 2,500,000.
48. Una composición de acuerdo con la reivindicación 46 en la que la polietilenoimina tiene un peso molecular de aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,800,000.
49. Una composición de acuerdo con la reivindicación 46 en la que la polietilenoimina tiene un peso molecular de aproximadamente 500,000 a aproximadamente 1,400,000.
50. Una composición de acuerdo con la reivindicación 33 en la que el portador comprende una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente seleccionados de - (gly)_{n1} -(arg)_{n2}, HIV-TAT y fragmentos de estos, y Antennapedia PTD y

220

fragmentos de estos, en la que el subíndice n_1 es un entero de 0 a aproximadamente 20, y el subíndice n_2 es independientemente un entero impar de aproximadamente 5 a aproximadamente 25.

51. Una composición de acuerdo con la reivindicación 50 en la cual los grupos ramificados cargados positivamente se seleccionan de los grupos que tienen la fórmula $-(\text{gly})_{n_1}-(\text{arg})_{n_2}$.
52. Una composición de acuerdo con la reivindicación 51 en la que el subíndice n_1 es un entero de aproximadamente 1 a aproximadamente 8.
53. Una composición de acuerdo con la reivindicación 51 en la que el subíndice n_1 es un entero de aproximadamente 2 a aproximadamente 5.
54. Una composición de acuerdo con la reivindicación 51 en la que el subíndice n_2 es un número impar de aproximadamente 7 a aproximadamente 17.
55. Una composición de acuerdo con la reivindicación 51 en la que el subíndice n_2 es un número impar de aproximadamente 7 a aproximadamente 13.
56. Una composición de acuerdo con la reivindicación 50 en la cual los grupos ramificados se seleccionan de HIV-TAT y fragmentos de estos.

57. Una composición de acuerdo con la reivindicación 56 en la cual los grupos ramificados adheridos cargados positivamente son fragmentos HIV TAT que tienen la fórmula $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$, o $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$ en donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un entero de 0 a 20.
58. Una composición de acuerdo con la reivindicación 50 en la cual los grupos ramificados son grupos Antennapedia PTD o fragmentos de estos.
59. Una composición de acuerdo con la reivindicación 33 contiene aproximadamente entre 1×10^{-20} a aproximadamente 25% en peso del agente biológicamente activo y aproximadamente entre 1×10^{-19} a aproximadamente 30% en peso del portador.
60. Una composición del lanzamiento controlada de acuerdo con la reivindicación 33.
61. Un kit para administración de una composición de acuerdo con la reivindicación 1 a un sujeto comprende un dispositivo para suministrar el agente biológicamente activo y un portador que comprende una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente y que están presentes en una cantidad efectiva para suministro transdérmico.

62. Un kit de acuerdo con la reivindicación 60 en donde el agente biológicamente activo excluye insulina, toxinas botulinum, VEGF, y fragmentos de anticuerpo.
63. Un kit de acuerdo con la reivindicación 62 en la que la composición está contenida en un dispositivo para administrar la proteína biológicamente activa a un sujeto por vía de la piel o epitelio.
64. Un kit de acuerdo con la reivindicación 63 en el que el dispositivo es un parche epidérmico.
65. Un kit para administración de una proteína biológicamente activa a un sujeto comprende un dispositivo para suministrar la proteína biológicamente activa a la piel o epitelio y una composición que comprende un portador polimérico que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente seleccionados de $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT y fragmentos de estos, y Antennapedia PTD y fragmentos de estos, en el que el subíndice $n1$ es un entero de 0 a aproximadamente 20, y el subíndice $n2$ es independientemente un entero impar de aproximadamente 5 a aproximadamente 25, en donde la asociación entre el portador y la proteína biológicamente activa no es covalente.
66. Un kit de acuerdo con la reivindicación 65 en el que el dispositivo es un parche epidérmico.
67. Un método para administrar una proteína biológicamente activa a un sujeto comprende aplicar la proteína tópicamente a la piel o epitelio del

sujeto en conjunción con una cantidad efectiva de un portador que comprende una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente, en donde la asociación entre el portador y la proteína biológicamente activa no es covalente.

68. Un método de acuerdo con la reivindicación 66 en donde la composición provee mayor suministro transdérmico de la proteína biológicamente activa relacionada con el agente en la ausencia del portador.
69. Un método de acuerdo con la reivindicación 68 en el que la proteína biológicamente activa tiene actividad terapéutica.
70. Un método de acuerdo con la reivindicación 69 en el que la proteína terapéutica excluye insulina, toxinas botulinum, VEGF, y fragmentos de anticuerpo.
71. Un método de acuerdo con la reivindicación 69 en el que la proteína terapéutica no altera terapéuticamente los niveles de glucosa en la sangre.
72. Un método de acuerdo con la reivindicación 69 en el que la proteína terapéutica excluye a botulinum toxin.
73. Un método de acuerdo con la reivindicación 69 en el que la proteína terapéutica excluye fragmentos de anticuerpo.

74. Un método de acuerdo con la reivindicación 69 en el que la proteína terapéutica excluye VEGF.
75. Un método para administrar un agente biológicamente activo no nucleótido no proteína a un sujeto comprende aplicar tópicamente el agente biológicamente activo a la piel o epitelio del sujeto en conjunción con una cantidad efectiva de un portador que comprende una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente, en donde la asociación entre el portador y el agente biológicamente activo no es covalente.
76. Un método de acuerdo con la reivindicación 75 en donde la composición provee mayor suministro transdérmico del agente biológicamente activo relativo al agente en la ausencia del portador.
77. Un método de acuerdo con la reivindicación 76 en el que el agente biológicamente activo tiene una actividad terapéutica.
78. Un método de acuerdo con la reivindicación 75 en el que la proteína biológicamente activa y el portador se administran al sujeto en una composición que contiene ambos componentes
79. Un método de acuerdo con la reivindicación 75 en el que la proteína biológicamente activa y el portador se administran separadamente al sujeto.

80. Un método de acuerdo con la reivindicación 77 en el que la proteína biológicamente activa y el portador se administran al sujeto en una composición que contiene ambos componentes
81. Un método de acuerdo con la reivindicación 77 en el que el agente biológicamente activo y el portador se administran separadamente al sujeto.
82. Un método de acuerdo con la reivindicación 75 en la que la composición es una composición de liberación controlada.
83. Un método de acuerdo con la reivindicación 77 en la que la composición es una composición de liberación controlada.
84. Un método de acuerdo con la reivindicación 75 en el que el agente biológicamente activo no nucleótido no proteína es un agente antifúngico.
85. Una composición de acuerdo con la reivindicación 33 en el que un agente biológicamente activo es un agente antifúngico.
86. Una composición de acuerdo con la reivindicación 85 contiene aproximadamente entre 1×10^{-10} a aproximadamente 49.9% en peso del agente biológicamente activo y aproximadamente entre 1×10^{-9} a aproximadamente 50% en peso del portador.

87. Una composición del lanzamiento controlada de acuerdo con la reivindicación 85.
88. Una composición de acuerdo con la reivindicación 85 en el que el agente antifúngico se selecciona de amfoterisina B, fluconazol, flucitosina, itraconazol, cetoconazol, clotrimazol, econozol, griseofulvina, miconazol, nistatina, ciclopirox y similares.
89. Un kit para administración de un agente biológicamente activo no nucleótido no proteína a un sujeto comprende un dispositivo para administrar el agente a la piel o epitelio del sujeto y una composición de acuerdo con la reivindicación 33.
90. Un kit de acuerdo con la reivindicación 89 comprende adicionalmente un aplicador habitual.
91. Un kit de acuerdo con la reivindicación 89 en el que el agente es un agente antifúngico y la composición está contenida en un dispositivo para administración de un agente antifúngico a un sujeto por vía de placa de uñas o estructuras anatómicas adyacentes.
92. Un kit de acuerdo con la reivindicación 89 en el que el dispositivo es una placa de uñas protésica o laca.
93. Un método de acuerdo con la reivindicación 75 en el que el agente biológicamente activo es un agente para tratar o prevenir los síntomas de soriasis.

94. Un método de acuerdo con la reivindicación 84 en el que un agente antifúngico y el portador se administran al sujeto en una composición que contiene ambos componentes
95. Un método de acuerdo con la reivindicación 84 en el que el agente antifúngico y el portador se administran separadamente al sujeto.
96. Un método de acuerdo con la reivindicación 84 en la que la composición es una composición de liberación controlada.
97. Un método de acuerdo con la reivindicación 84 en el que el agente antifúngico se selecciona de amfoterisina B, fluconazol, flucitosina, itraconazol, cetoconazol, clotrimazol, econozol, griseofulvina, miconazol, nistatina, ciclopirox y similares.
98. Un método de acuerdo con la reivindicación 84 en el que el agente antifúngico se administra para tratar los síntomas y signos de una fúngica.
99. Un método de acuerdo con la reivindicación 84 en el que el agente antifúngico se administra para alterar síntomas o signos de infección fúngica de la placa de uñas o lecho de uña.
100. Una composición que comprende un antígeno adecuado para inmunización y un portador que comprende una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente y que

están presentes en una cantidad efectiva para suministro transdérmico, en donde la asociación entre el portador y el antígeno no es covalente.

101. Una composición de acuerdo con la reivindicación 100 en el que la estructura comprende un polipéptido cargado positivamente.

102. Una composición de acuerdo con la reivindicación 101 en el que la estructura comprende un polipéptido cargado positivamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 1,500,000.

103. Una composición de acuerdo con la reivindicación 101 en el que la estructura comprende un polipéptido cargado positivamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 25,000 a aproximadamente 1,200,000.

104. Una composición de acuerdo con la reivindicación 101 en el que la estructura comprende un polipéptido cargado positivamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,000,000.

105. Una composición de acuerdo con la reivindicación 101 en el que la estructura comprende una polilisina cargada positivamente.

106. Una composición de acuerdo con la reivindicación 105 en el que la estructura comprende una polilisina cargada positivamente que tiene

un peso molecular de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 1,500,000.

107. Una composición de acuerdo con la reivindicación 105 en el que la estructura comprende una polilisina cargada positivamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 25,000 a aproximadamente 1,200,000.

108. Una composición de acuerdo con la reivindicación 105 en el que la estructura comprende una polilisina cargada positivamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,000,000.

109. Una composición de acuerdo con la reivindicación 100 en el que la estructura comprende un polímero no peptídico cargado positivamente.

110. Una composición de acuerdo con la reivindicación 109 en el que la estructura del polímero no peptídico comprende una polialquilamina cargada positivamente.

111. Una composición de acuerdo con la reivindicación 110 en el que la polialquilenimina es una polietilenoimina.

112. Una composición de acuerdo con la reivindicación 111 en el que la polietilenoimina tiene un peso molecular de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 2,500,000.

113. Una composición de acuerdo con la reivindicación 111 en el que la polietilenoimina tiene un peso molecular de aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,800,000.
114. Una composición de acuerdo con la reivindicación 111 en el que la polietilenoimina tiene un peso molecular de aproximadamente entre 500,000 a aproximadamente 1,400,000.
115. Una composición de acuerdo con la reivindicación 100 en el que el portador comprende una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente seleccionados de $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT y fragmentos de estos, y Antennapedia PTD, en el que el subíndice $n1$ es un entero de 0 a aproximadamente 20, y el subíndice $n2$ es independientemente un entero impar de aproximadamente 5 a aproximadamente 25.
116. Una composición de acuerdo con la reivindicación 115 en el que los grupos ramificados cargados positivamente se seleccionan de los grupos que tienen la fórmula $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$.
117. Una composición de acuerdo con la reivindicación 116 en el que el subíndice $n1$ es un entero de aproximadamente 1 a aproximadamente 8.
118. Una composición de acuerdo con la reivindicación 116 en el que el subíndice $n1$ es un entero de aproximadamente 2 a aproximadamente 5.

119. 119. Una composición de acuerdo con la reivindicación 116 en el que el subíndice n_2 es un número impar de aproximadamente 7 a aproximadamente 17.
120. Una composición de acuerdo con la reivindicación 116 en el que el subíndice n_2 es un número impar de aproximadamente 7 a aproximadamente 13.
121. Una composición de acuerdo con la reivindicación 115 en el que los grupos ramificados se seleccionan de HIV-TAT y fragmentos de estos.
122. Una composición de acuerdo con la reivindicación 121 en el que los grupos ramificados adheridos cargados positivamente son fragmentos HIV TAT que tienen la fórmula $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$, o $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$ en donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un entero de 0 a 20.
123. Una composición de acuerdo con la reivindicación 115 en el que los grupos ramificados son grupos Antennapedia PTD.
124. Una composición de acuerdo con la reivindicación 115 en el que el polímero cargado positivamente comprende un polipéptido.

125. Una composición de acuerdo con la reivindicación 124 en el que el polipéptido se selecciona de polilisinas, poliargininas, poliomitinas, y polihomoargininas.
126. Una composición de acuerdo con la reivindicación 125 en el que el polipéptido es una polilisina.
127. Una composición de acuerdo con la reivindicación 115 en el que el polímero comprende un polímero no peptídico cargado positivamente.
128. Una composición de acuerdo con la reivindicación 127 en el que el polímero no peptídico comprende una polialquilamina cargada positivamente.
129. Una composición de acuerdo con la reivindicación 128 en el que la polialquiloimina es una poliemilenoimina.
130. Una composición de acuerdo con la reivindicación 100 contiene aproximadamente entre 1×10^{-10} a aproximadamente 49.9% en peso del antígeno y aproximadamente entre 1×10^{-9} a aproximadamente 50% en peso del portador.
131. Una composición del lanzamiento controlada de acuerdo con la reivindicación 100.

132. Una composición de acuerdo con la reivindicación 100 en el que el antígeno excluye insulina, toxinas botulinum, VEGF, y fragmentos de anticuerpo.
133. Una composición de acuerdo con la reivindicación 100 en el que el antígeno es adecuado para inmunizaciones infantiles.
134. Un kit para administración de un antígeno adecuado para inmunización a un sujeto comprende un dispositivo para suministrar el antígeno adecuado para inmunización a la piel o epitelio y una composición que comprende un portador que consiste de una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente seleccionados de $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT y fragmentos de estos, y Antennapedia PTD, en el que el subíndice $n1$ es un entero de 0 a aproximadamente 20, y el subíndice $n2$ es independientemente un entero impar de aproximadamente 5 a aproximadamente 25, en donde la asociación entre el portador y el antígeno no es covalente.
135. Un kit para administración de un antígeno adecuado para inmunización a un sujeto comprende un dispositivo para suministrar el antígeno al -smn o epitelio y una composición de acuerdo con la reivindicación 100.
136. Un kit de acuerdo con la reivindicación 134 comprende adicionalmente un aplicador habitual.

137. Un kit de acuerdo con la reivindicación 134 en la que la composición está contenida en un dispositivo para suministrar un antígeno adecuado para inmunización a un sujeto por vía de la piel o epitelio.
138. Un kit de acuerdo con la reivindicación 134 en el que el dispositivo se aplica tópicamente.
139. Un kit de acuerdo con la reivindicación 134 en el que el dispositivo es un parche epidérmico.
140. Un método para administrar un antígeno adecuado para inmunización a un sujeto comprende aplicar tópicamente a la piel o epitelio del sujeto el antígeno adecuado para inmunización en conjunción con una cantidad efectiva de un portador que comprende una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente, en donde la asociación entre el portador y el antígeno no es covalente.
141. Un método de acuerdo con la reivindicación 140 en el que el antígeno adecuado para inmunización y el portador se administran al sujeto en una composición que contiene ambos componentes
142. Un método de acuerdo con la reivindicación 140 en el que el antígeno adecuado para inmunización y el portador se administran separadamente al sujeto.
- .

143. Un método de acuerdo con la reivindicación 140 en el que la estructura comprende un polipéptido cargado positivamente.
144. Un método de acuerdo con la reivindicación 143 en el que la estructura comprende un polipéptido cargado positivamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 1,500,000.
145. Un método de acuerdo con la reivindicación 143 en el que la estructura comprende un polipéptido cargado positivamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 25,000 a aproximadamente 1,200,000.
146. Un método de acuerdo con la reivindicación 143 en el que la estructura comprende un polipéptido cargado positivamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,000,000.
147. Un método de acuerdo con la reivindicación 143 en el que la estructura comprende una polilisina cargada positivamente.
148. Un método de acuerdo con la reivindicación 147 en el que la estructura comprende una polilisina cargada positivamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 1,500,000.
149. Un método de acuerdo con la reivindicación 147 en el que la estructura comprende una polilisina cargada positivamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 25,000 a aproximadamente 1,200,000.

150. Un método de acuerdo con la reivindicación 147 en el que la estructura comprende una polilisina cargada positivamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,000,000.
151. Un método de acuerdo con la reivindicación 140 en el que la estructura comprende un polímero no peptídico cargado positivamente.
152. Un método de acuerdo con la reivindicación 151 en el que la estructura de polímero no peptídico comprende una polialquilamina cargada positivamente.
153. Un método de acuerdo con la reivindicación 152 en el que la polialquilenimina es una polietilenoimina.
154. Un método de acuerdo con la reivindicación 153 en el que la polietilenoimina tiene un peso molecular de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 2,500,000.
155. Un método de acuerdo con la reivindicación 153 en el que la polietilenoimina tiene un peso molecular de aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,800,000.
156. Un método de acuerdo con la reivindicación 153 en el que la polietilenoimina tiene un peso molecular de aproximadamente 500,000 a aproximadamente 1,400,000.

157. Un método de acuerdo con la reivindicación 140 en el que el portador comprende una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente seleccionados de $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ HIV-TAT y fragmentos de estos, y Antennapedia PTD, en el que el subíndice $n1$ es un entero de 0 a aproximadamente 20, y el subíndice $n2$ es independientemente un entero impar de aproximadamente 5 a aproximadamente 25.

158. Un método de acuerdo con la reivindicación 157 en el que los grupos ramificados cargados positivamente se seleccionan de los grupos que tienen la fórmula $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$.

159. Un método de acuerdo con la reivindicación 158 en el que el subíndice $n1$ es un entero de aproximadamente 1 a aproximadamente 8.

160. Un método de acuerdo con la reivindicación 158 en el que el subíndice $n1$ es un entero de aproximadamente 2 a aproximadamente 5.

161. Un método de acuerdo con la reivindicación 158 en el que el subíndice $n2$ es un número impar de aproximadamente 7 a aproximadamente 17.

162. Un método de acuerdo con la reivindicación 158 en el que el subíndice $n2$ es un número impar de aproximadamente 7 a aproximadamente 13.

163. Un método de acuerdo con la reivindicación 157 en el que los grupos ramificados se seleccionan de HIV-TAT y fragmentos de estos.

164. Un método de acuerdo con la reivindicación 163 en el que los grupos ramificados adheridos cargados positivamente son fragmentos HIV-TAT que tienen la fórmula $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$ o $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$ en donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un entero de 0 a 20.
165. Un método de acuerdo con la reivindicación 157 en el que los grupos ramificados son grupos Antennapedia PTD.
166. Un método de acuerdo con la reivindicación 157 en el que el polímero cargado positivamente comprende un polipéptido.
167. Un método de acuerdo con la reivindicación 166 en el que el polipéptido se selecciona de polilisinas, poliargininas, poliornitinas, y polihomoargininas.
168. Un método de acuerdo con la reivindicación 167 en el que el polipéptido es una polilisina.
169. Un método de acuerdo con la reivindicación 157 en el que el polímero comprende un polímero no peptídico cargado positivamente.
170. Un método de acuerdo con la reivindicación 169 en el que el polímero no peptídico comprende una polialquilamina cargada positivamente.

171. Un método de acuerdo con la reivindicación 170 en el que la polialquilenoimina es una polietilenoimina.
172. Un método de acuerdo con la reivindicación 140 en la que la composición es una composición de liberación controlada.
173. Un método de acuerdo con la reivindicación 140 en el que el antígeno adecuado para inmunización excluye insulina, toxinas botulinum, VEGF5 y fragmentos de anticuerpo.
174. Un método de acuerdo con la reivindicación 140 en el que el antígeno es adecuado para inmunizaciones infantiles.
175. Un método de acuerdo con la reivindicación 140 en el que se administra el antígeno adecuado para inmunización para suministrar resistencia a un antígeno ambiental.
176. Un método de acuerdo con la reivindicación 140 en el que se administra el antígeno adecuado para inmunización para suministrar resistencia a un patógeno potencial
177. Un método de acuerdo con la reivindicación 140 en el que se administra el antígeno adecuado para inmunización para suministrar resistencia para un bioriesgo potencial.
178. Una composición que comprende una porción formadora de imagen y un agente objetivo y un portador que comprende una estructura

polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente y que están presentes en una cantidad efectiva para suministro transdérmico, en donde la asociación entre el portador y la porción de imagen o agente objetivo no es covalente.

179. Una composición de acuerdo con la reivindicación 178 en el que el agente formador de imágenes es un agente de imagen óptica.

180. Una composición de acuerdo con la reivindicación 179 en el que el agente formador de imágenes selecciona de Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, verde Oregon 488, verde Oregon 500, verde Oregon 514, proteína fluorescente Verde, 6-FAM, Rojo Texas, Hex, TET, y HAMRA.

181. Una composición de acuerdo con la reivindicación 178 en el que el agente formador de imágenes adecuado para imagen de resonancia magnética

182. Una composición de acuerdo con la reivindicación 178 en el que el agente objetivo reconoce melanoma.

183. Un kit para administración de una composición de acuerdo con la reivindicación 178 a un sujeto comprende un dispositivo para suministrar las porciones formadoras de imagen y objetivo y un portador que comprende una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente y que están presentes en una cantidad efectiva para suministro transdérmico.

184. Un método para administrar una porción de imagen y un agente objetivo a un sujeto comprende aplicar tópicamente a la piel o epitelio del sujeto la porción de imagen y agente objetivo en conjunción con una cantidad efectiva de un portador que comprende una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente, en donde la asociación entre el portador y la proteína biológicamente activa no es covalente.
185. Un método de acuerdo con la reivindicación 184 en el que el agente formador de imágenes es un agente de imagen óptica.
186. Un método de acuerdo con la reivindicación 185 en el que el agente formador de imágenes selecciona de Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, verde Oregon 488, verde Oregon 500, verde Oregon 514, proteína fluorescente Verde, 6-FAM, Rojo Texas, Hex, TET, y HAMRA.
187. Un método de acuerdo con la reivindicación 184 en el que el agente formador de imágenes adecuado para imagen de resonancia magnética
188. Un método de acuerdo con la reivindicación 184 en el que el agente objetivo reconoce melanoma.
189. Un método de acuerdo con la reivindicación 184 en la que la composición se aplica para la selección de pacientes en peligro de melanoma.

190. Un método de acuerdo con la reivindicación 184 en la que la composición se aplica para ayudar a la extirpación quirúrgica del melanoma.

191. Un método de acuerdo con la reivindicación 184 en la que la composición se aplica en conjunción con técnicas fotográficas o técnicas de análisis de imagen.

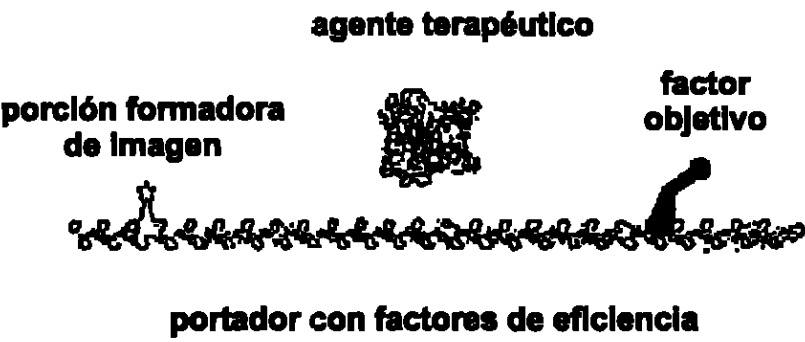


FIGURA 1

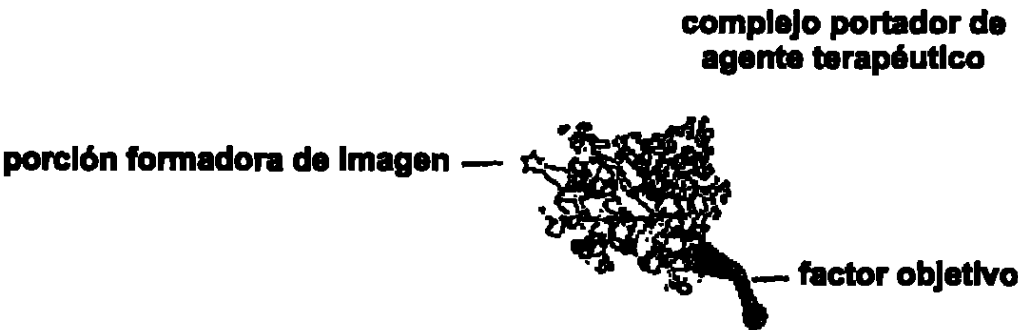


FIGURA 2

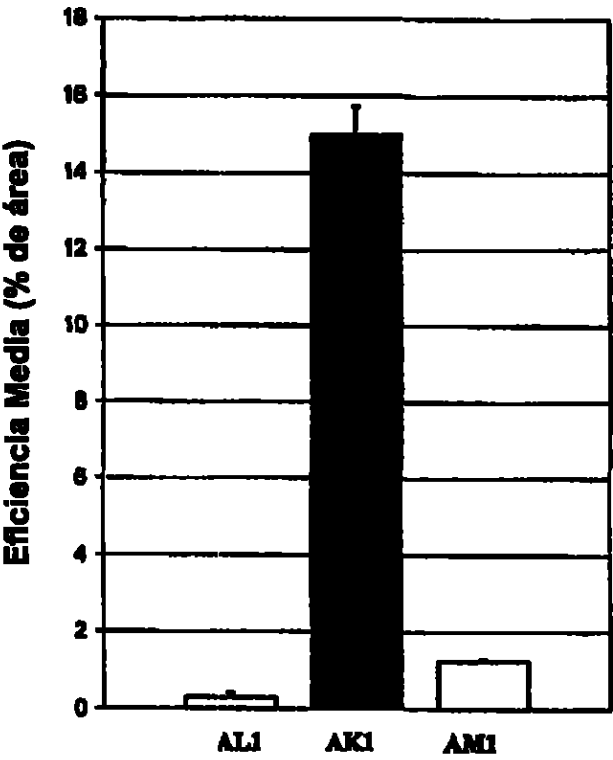


FIGURA 3 (% de células que muestran positivo)

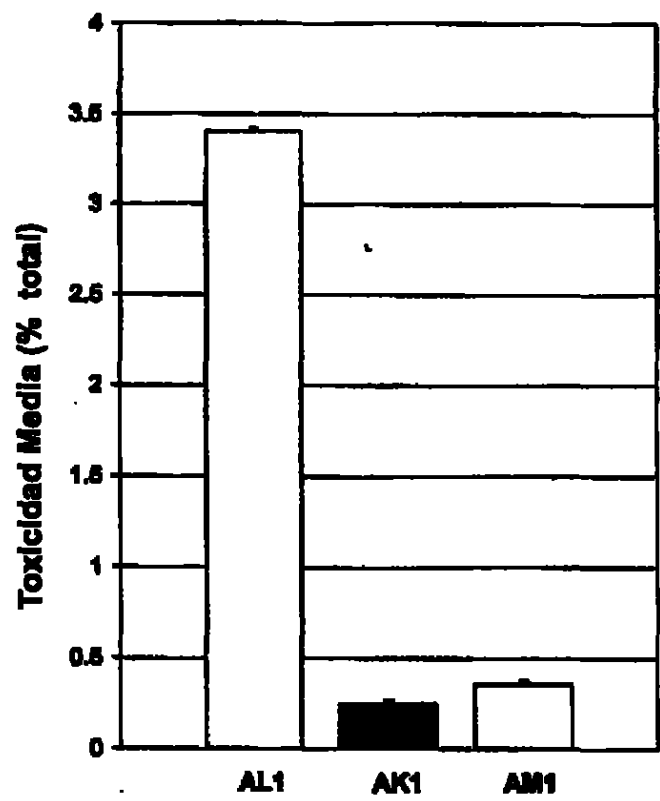


FIGURA 4 (% de células no viables media)

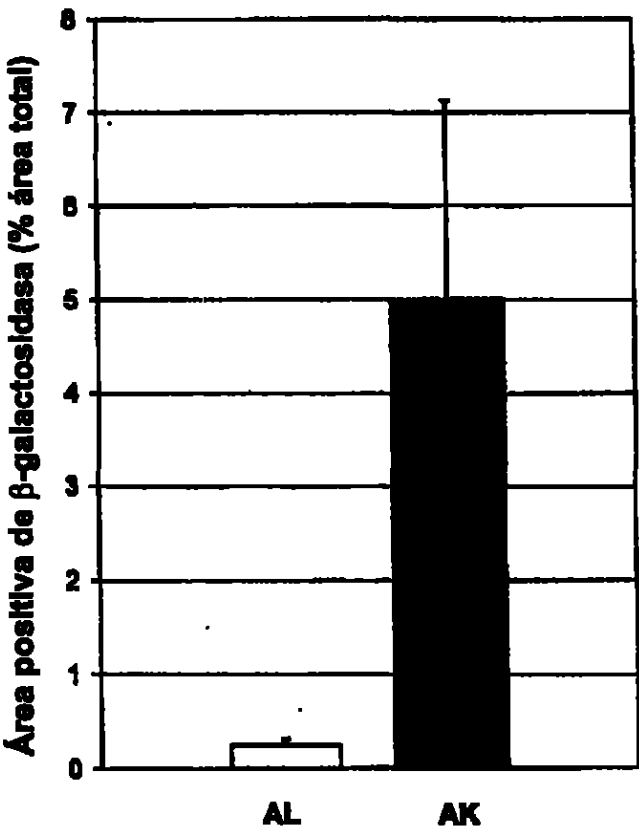


FIGURA 5 (7 días de administración una vez diariamente)

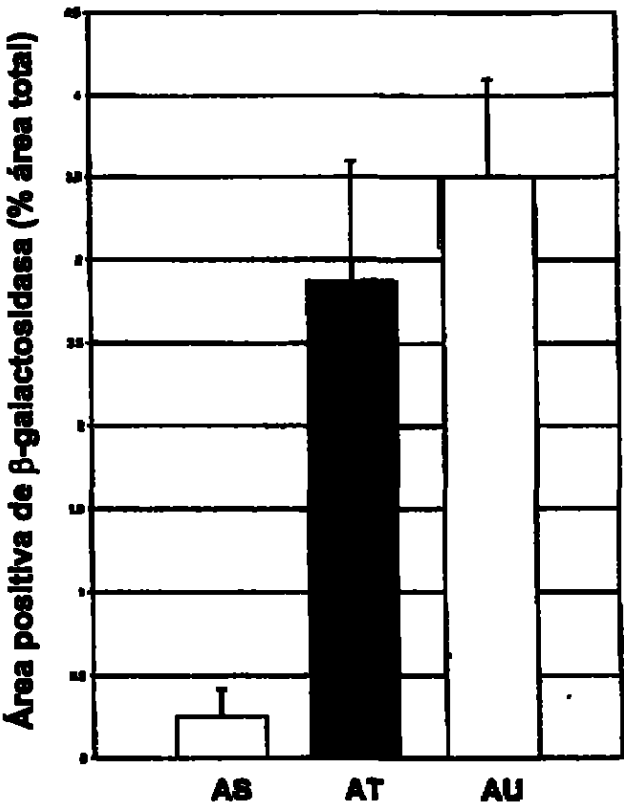


FIGURA 6 (eficiencia de suministro transdérmico)

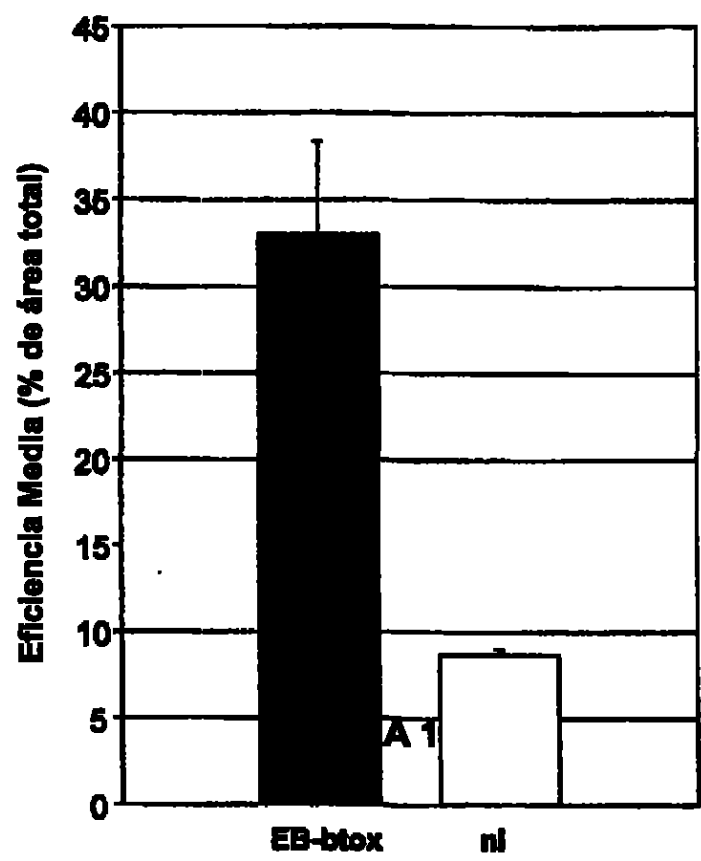


FIGURA 7 (eficiencia de suministro transdérmico)

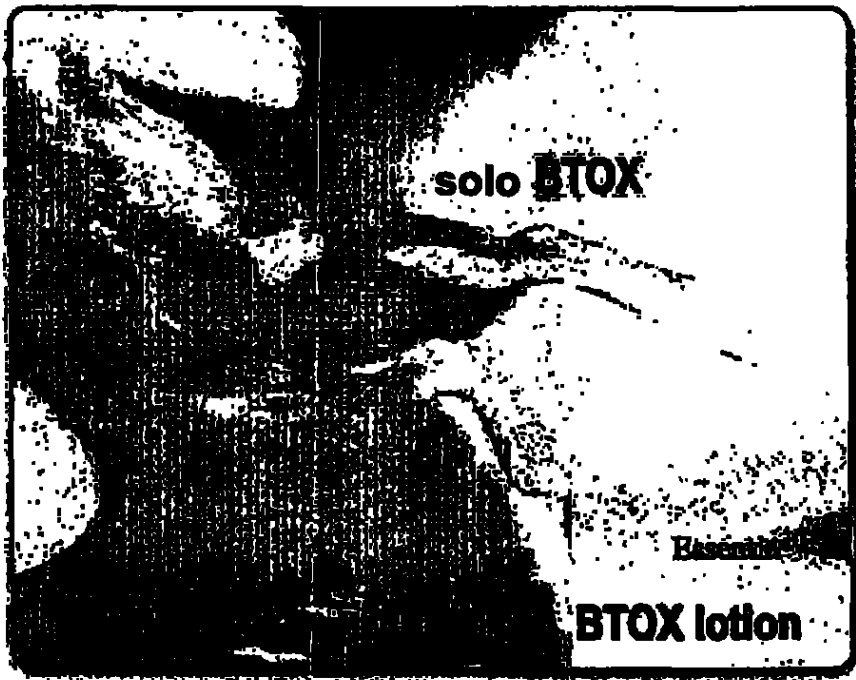


FIGURA 8

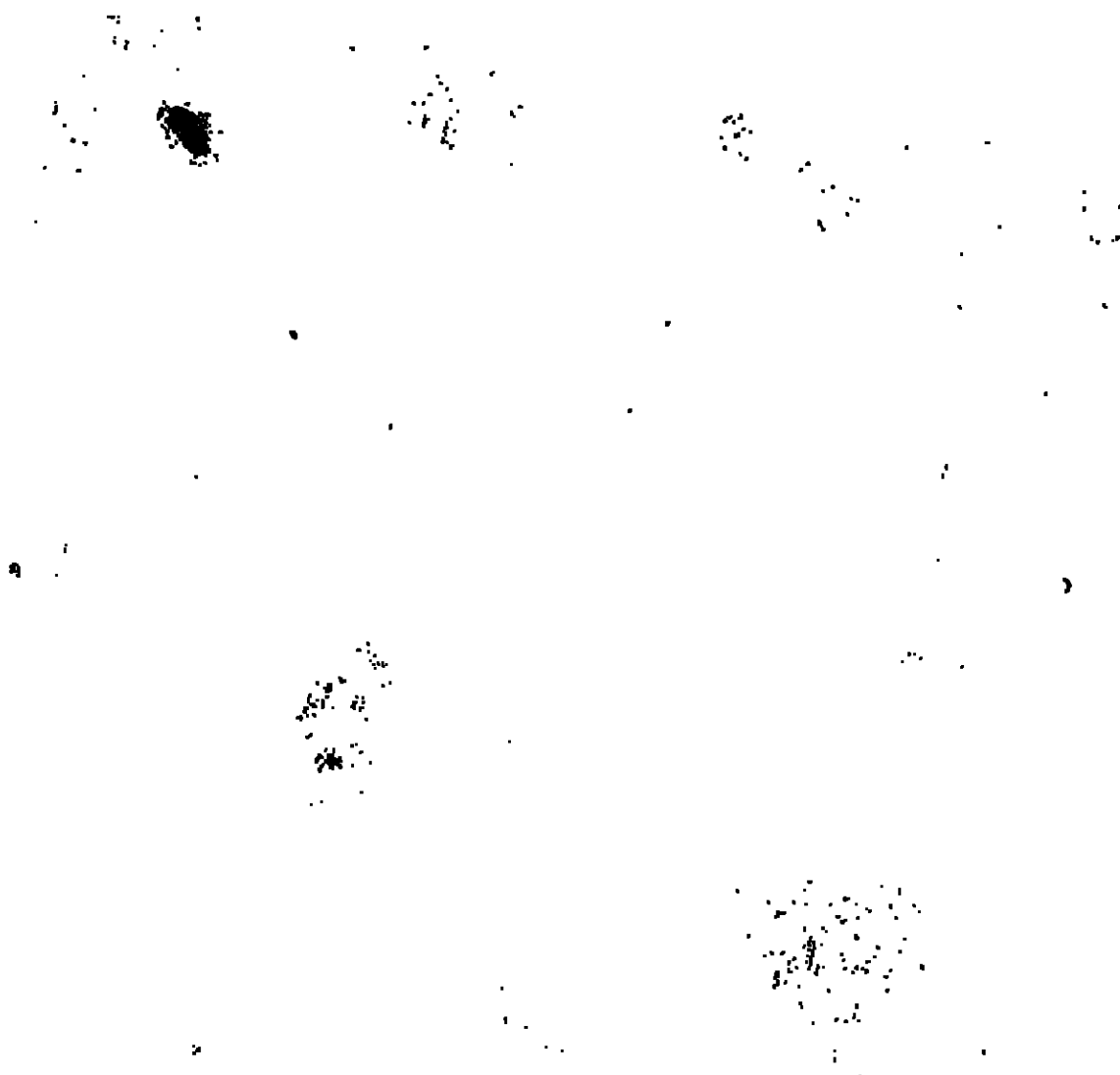
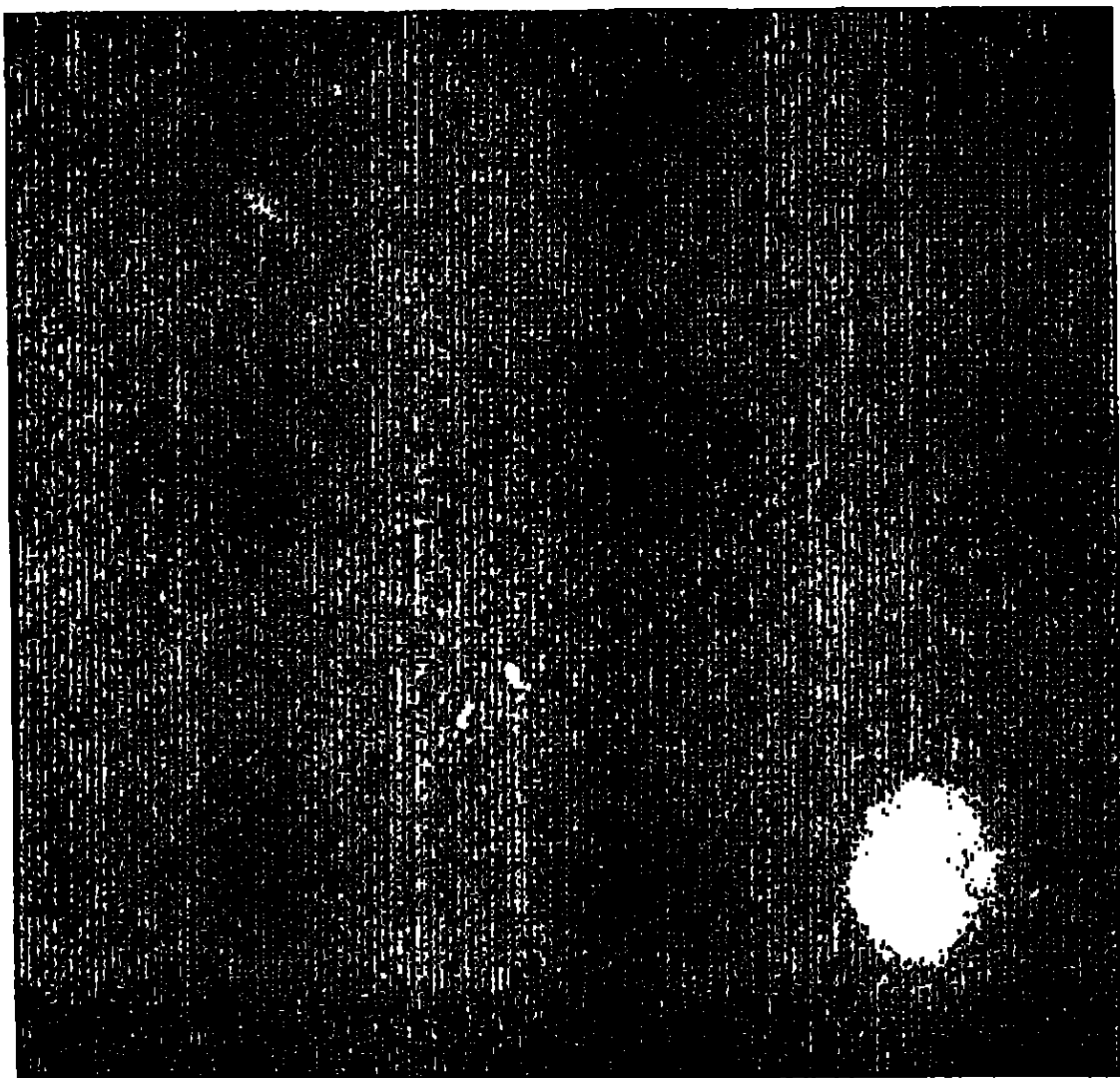
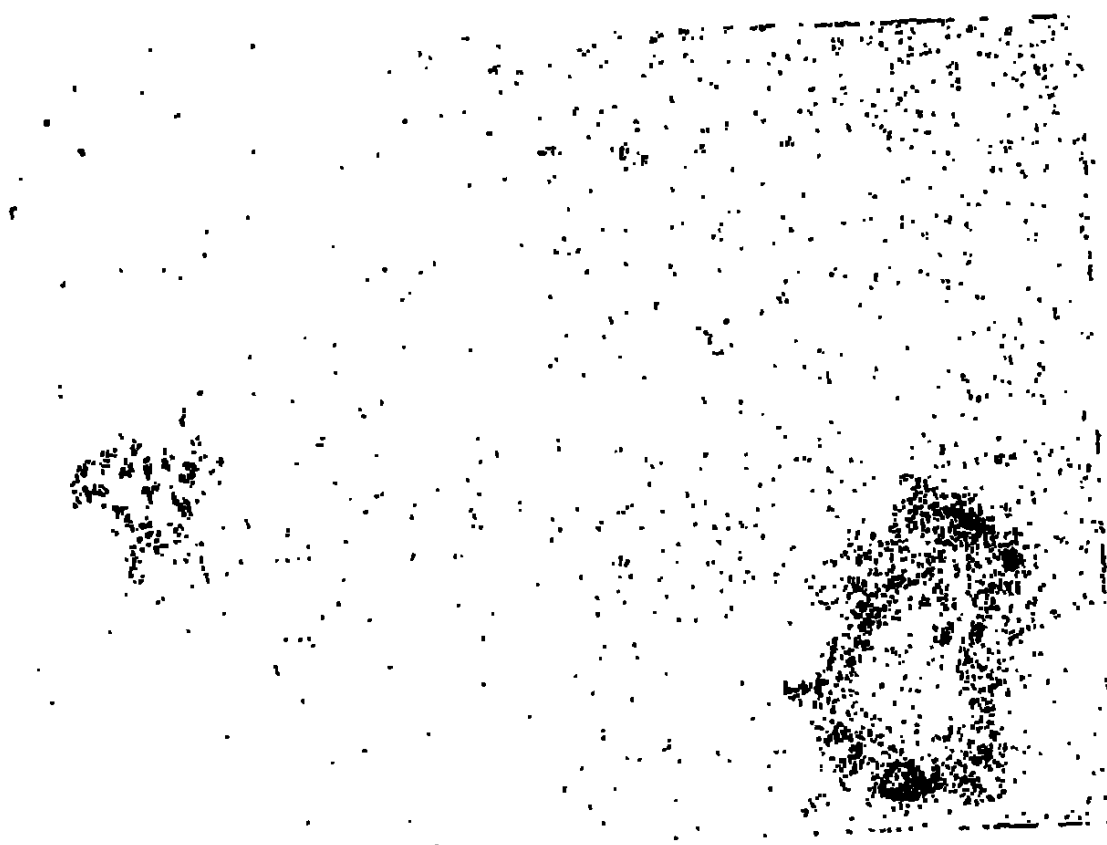


FIGURA 9A

**FIGURA 9B**

**FIGURA 9C**

LS3
254

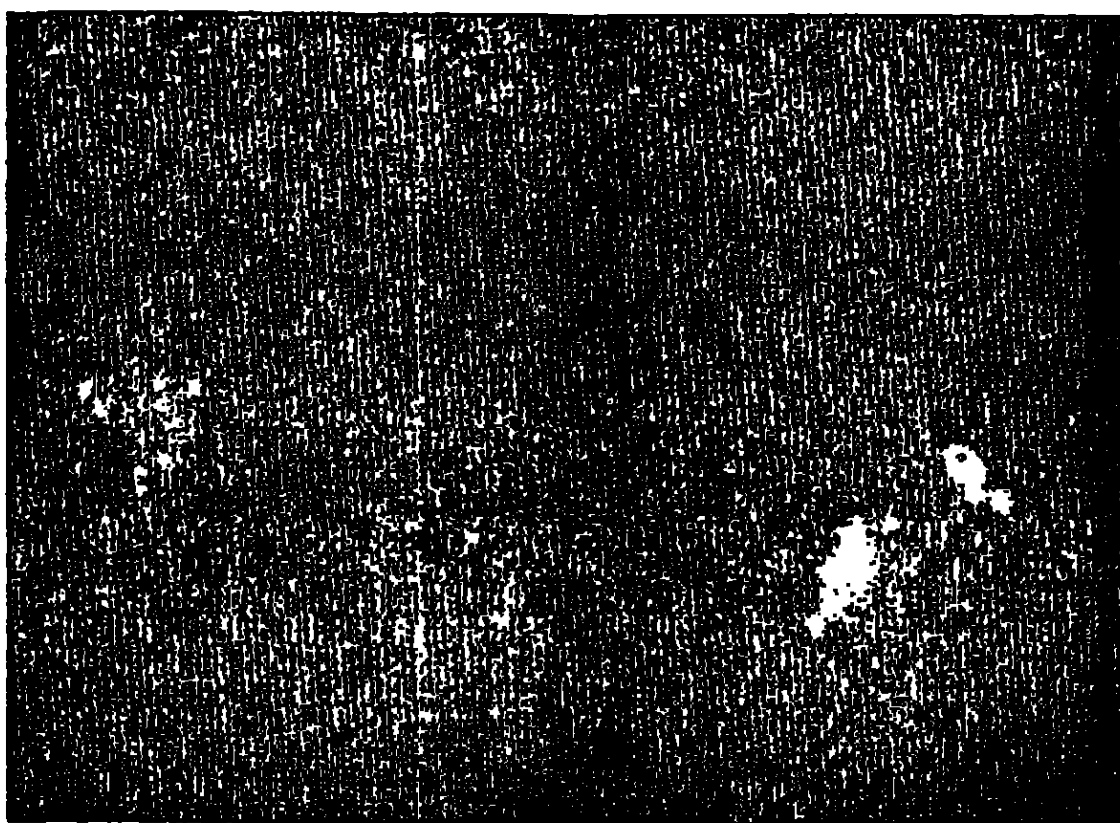


FIGURA 9D

254
255

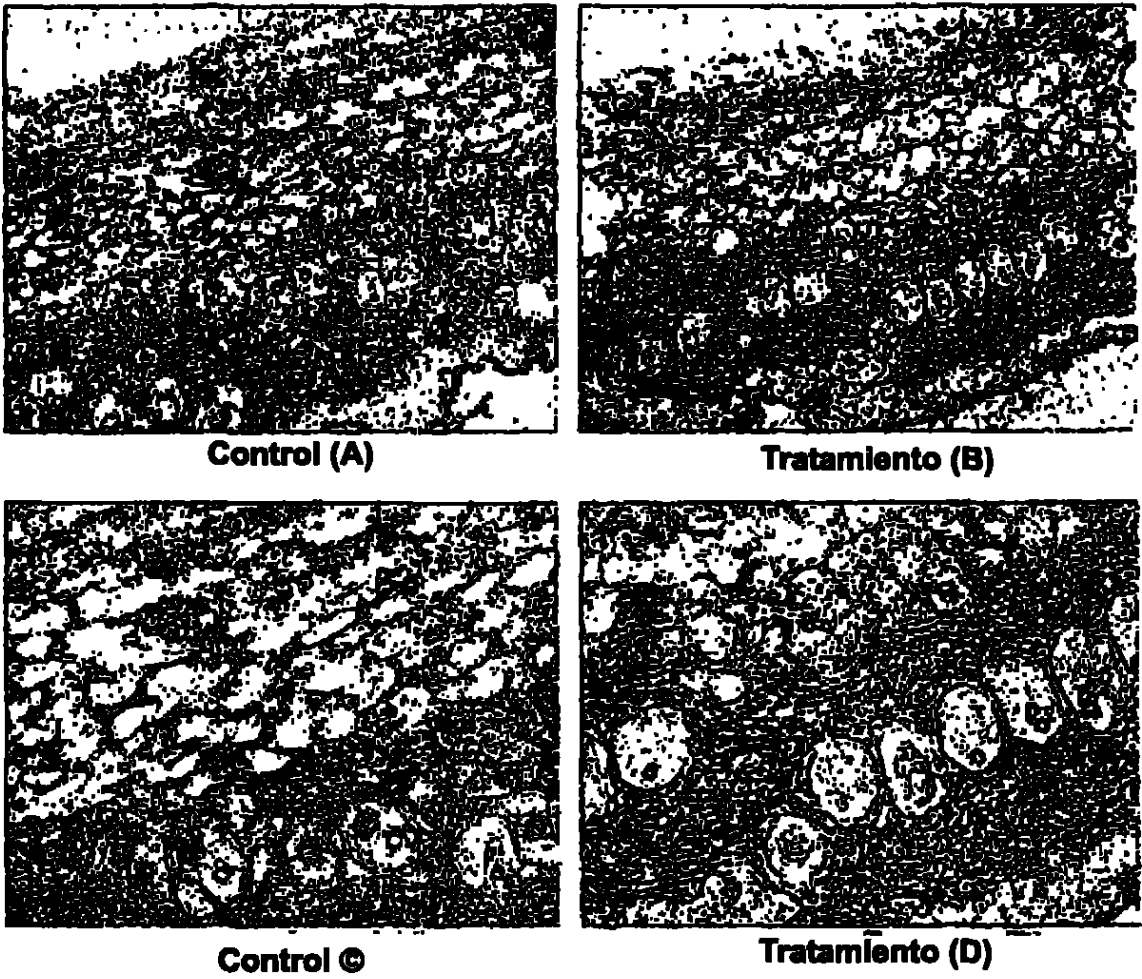
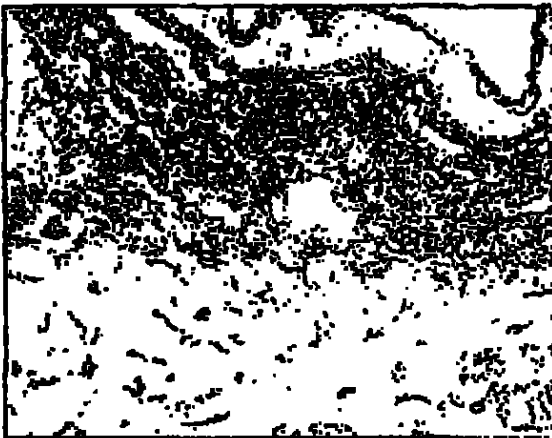
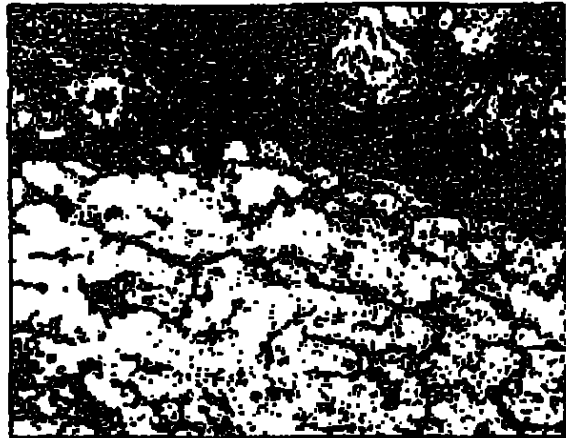


FIGURA 10a

255
256



Control (E)



Control (F)

FIGURA 10b

256
257

Relativa Toxicidad de Estructuras de Portadores

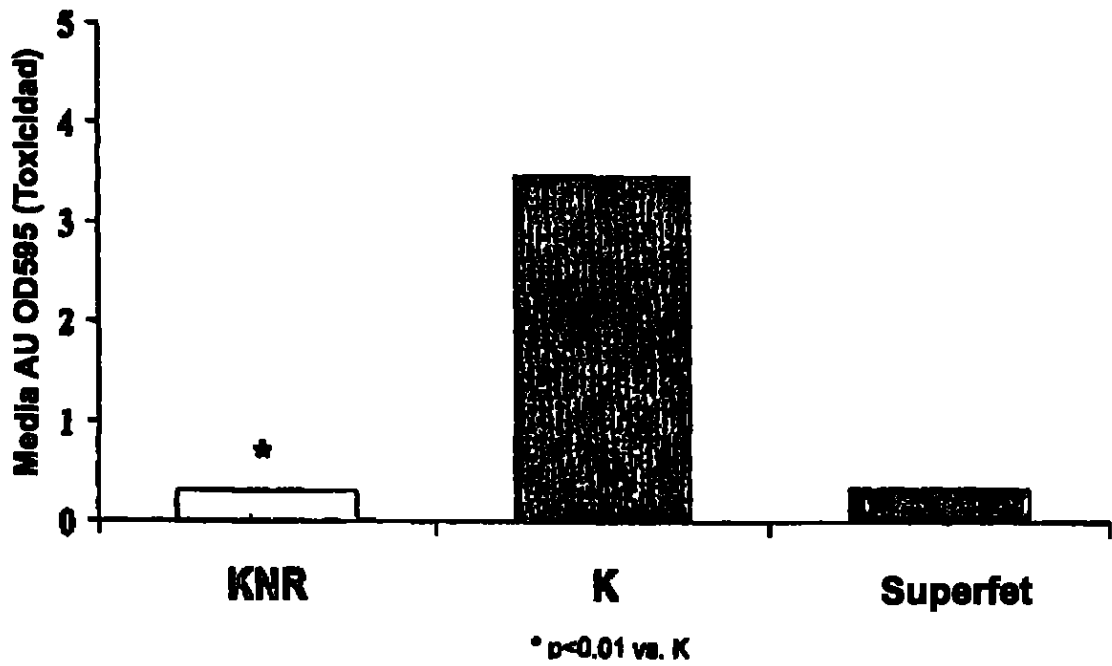


FIGURA 11

257
258

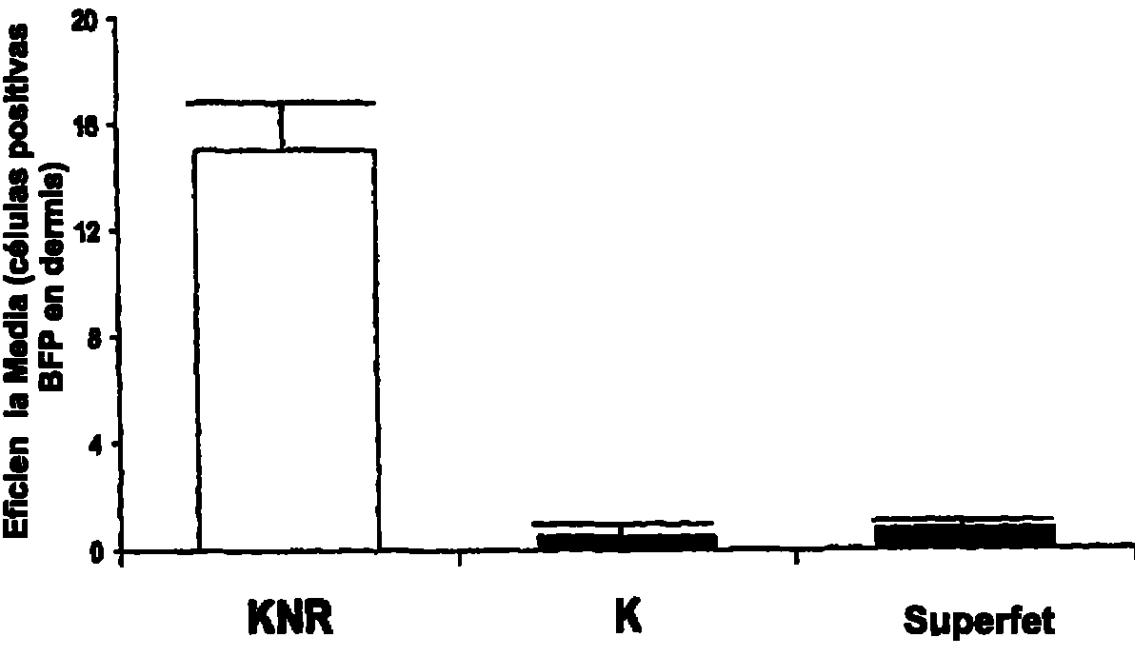
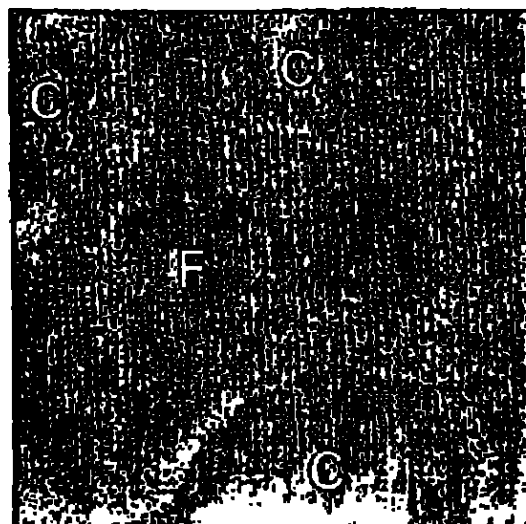


FIGURA 12

258
289



PANEL A



PANEL B

FIGURA 13

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 06 - 98638 (22) Fecha de solicitud: 29/09/06 (30) Prioridad (31) 60/550,014 (32) 03/03/04 (33) US		(51) Int Cl: A61K 038/017 (71) Solicitante(s) ESSENTIA BIOSYSTEMS, INC. (72) Inventor(es) MICHAEL D. DAKE JACOB M. WAUGH (74) Apoderado: EMILIO FERRERO	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 03/10/2006 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 03/03/2005 No. de solicitud PCT/US2005/006931		(87) Publicación Internacional Fecha: 22/12/2005 N° publicación: WO 2005/120546 A2	
(54) Título: COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO TÓPICO Y TRANSPORTE TERAPÉUTICO			

Reivindicación(es):

1. Una composición que comprende una proteína biológicamente activa y un portador que comprende una estructura polimérica que tiene grupos ramificados adheridos cargados positivamente y que están presentes en una cantidad efectiva para suministro transdérmico, en donde la asociación entre el portador y la proteína biológicamente activa no es covalente.
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la cual la proteína terapéutica excluye insulina, toxinas botulinum, VEGF, y fragmentos de anticuerpo.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2 en la cual la proteína terapéutica no altera terapéuticamente los niveles de glucosa en la sangre.
4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2 en la que la proteína terapéutica excluye toxinas botulinum.
5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2 en la que la proteína terapéutica excluye VEGF.
6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2 en la que la proteína terapéutica excluye fragmentos de anticuerpo.
7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la composición provee mayor suministro transdérmico a la proteína biológicamente activa relacionada con el agente en la ausencia del portador.
8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 7 en la que la proteína biológicamente activa tiene actividad terapéutica.
9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8 en la que la proteína terapéutica tiene un peso molecular de menos de 20,000 kD.
10. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la estructura comprende un polipéptido cargado positivamente.

FORMATO DE DIGITALIZACION
RELACION DE ANEXOS

Expediente No		No de unidades	No de Folio
Item			
1	CD		✓
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA		
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA X	1	←
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS:		

Observaciones: *Así se Final*

262

26A
262

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Red: 06-000638- 00000-0000
Fec: 2006-09-29 17:48:59 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tm. 11 PATENTEMII
Eva: 378 FASENACIONALJ
Act 411 PRESENTACION Folios: 262

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 73,831
FECHA : SEPTIEMBRE 25 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	48872311	25/09/2006	44,980,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1	TRANITES DE SOL. DE PATENTE DE IN
			TOTAL : \$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE :


Cdo 14137-841-005-1 15550-841-002-6



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-098638- -00000-0000
Fec: 2008-09-29 17:48:59 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tit. 11 PATENTERYI
Eps: 376 PASSENCIONALJ
Act 411 PRESENTACION Folio 282

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION (☒) MODELO DE UTILIDAD ()	()	()
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	(☒)	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	(☒)	()
-Descripción de la invención.	(☒)	()
-Dibujos de ser estos pertinentes.	(☒)	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	(☒)	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()

Firma Responsable:

Fecha:

Sept 29 de 2006

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO

REFERENCIA	Radicación No.	06 98638
	Solicitud internacional	PCT/US2005/006931
	Fecha inicio fase nacional	03/10/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	00013591

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 24 NOV. 2006 salvado