



06-98643

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

06-98643

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

SISTEMA DE TRANSPORTE BIOLOGICO MULTICOMPONENTE

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

ESSENTIA BIOSYSTEMS, INC.

DOMICILIO

MOUNTAIN VIEW, CALIFORNIA 94043, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

PHILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Rad: 06-098643- -00000-0000

Fec. 2006-09-29 17 54 43 Dep 2020 NUECREACIONES

Tra 11 PATENTEIYI

Eve 378 FASENACIONALI

Act 449 DEBERENT&PITM

Folios 700

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT****ENTRADA EN FASE NACIONAL 03.20.06****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 AméricaDirección 1928B Old Middlefield Way
Mountain View
California 94043
Estados Unidos de AméricaDomicilio 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. Jacob M. WAUGH**
4020 El Camino Real #1116
Mountain View
California 94040
Estados Unidos de América**2. Michael D. DAKE**
665 Geron Road
Stanford
California 94305
Estados Unidos de América**5****PCT (86)**Solicitud Internacional No. PCT/US2005/006930Fecha. 3 de marzo de 2005Publicación Internacional No. WO 2005/084361 A2Fecha. 15 de septiembre de 2005**6****Título (54)****SISTEMA DE TRANSPORTE BIOLOGICO MULTICOMPONENTE****7****Clasificación Internacional (51) A61K 38/00****8****Prioridad**

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

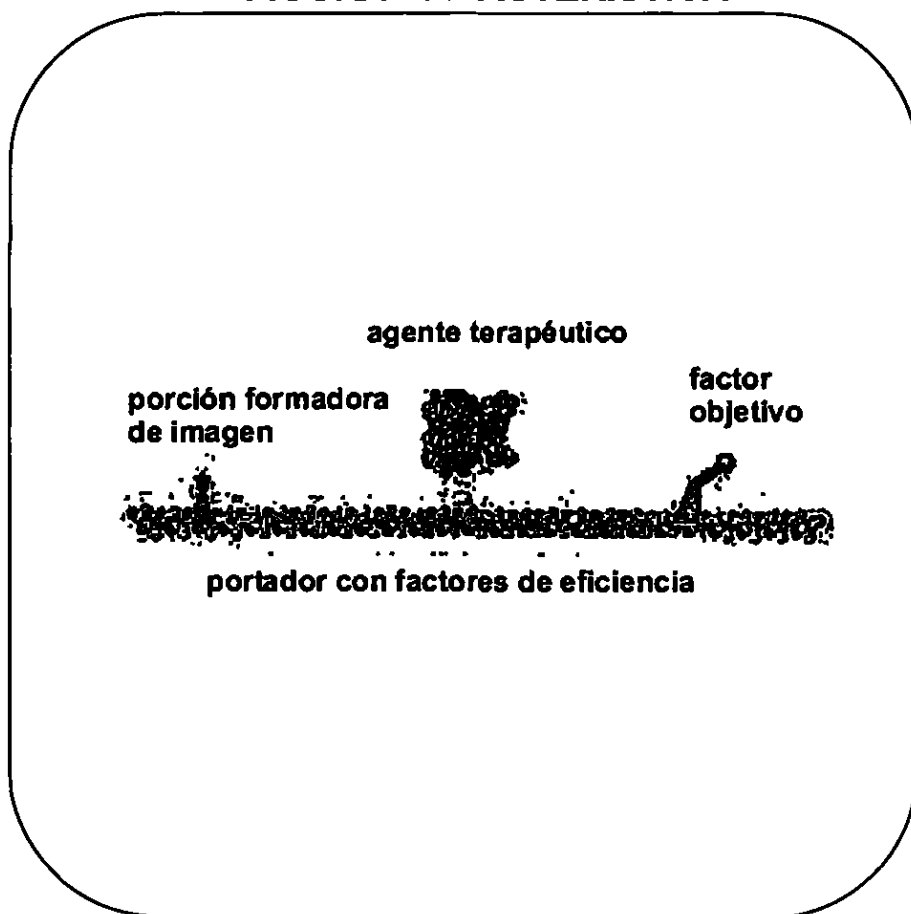
SI ☒ NO ☐US3 de marzo de 200410/793,138**9****Comprobante de pago No.: 06-73,832****Fecha: 25 de septiembre de 2006**Fecha límite inicio F.N. 3/10/2006

10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 463 000 oo.
- ☐ 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 :

Emilio Ferrero
C.C 438 019 de Usaquén T.P 31 929

JDF

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2005/084361 A2
2. ☒ **Forma PCT/ISA/210**. Informe de Búsqueda Internacional.
3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN
FASE INTERNACIONAL**

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



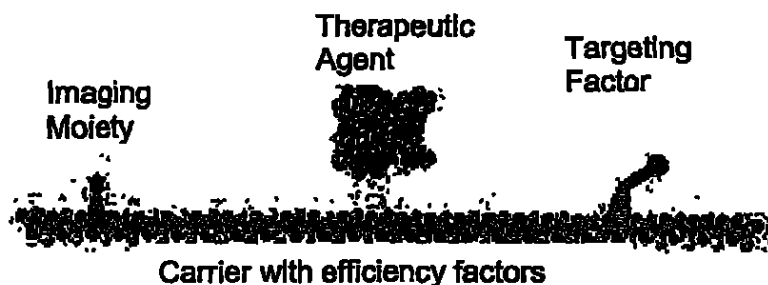
(43) International Publication Date
15 September 2005 (15.09.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/084361 A2

- (51) International Patent Classification: Not classified
- (21) International Application Number: PCT/US2005/006930
- (22) International Filing Date: 3 March 2005 (03.03.2005)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
10/793,138 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): WAUGH, Jacob M., 4020 El Camino Real #1116, Mountain View, California 94040 (US) DAKE, Michael D.; 665 Gerona Road, Stanford, California 94305 (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: MULTI-COMPONENT BIOLOGICAL TRANSPORT SYSTEMS



(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 2005/084361 A2

MULTI-COMPONENT BIOLOGICAL TRANSPORT SYSTEMS

CROSS-REFERENCES TO RELATED APPLICATIONS

5 [0001] This application is a continuation-in-part of U.S. Application Number 09/910,432 filed July 20, 2001, which in turn claims priority to U.S. Provisional Application Ser. No. 60/220,244, filed July 21, 2000, the contents of which are incorporated herein by reference in its entirety

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

[0002] Not applicable

BACKGROUND OF THE INVENTION

15 [0003] Gene delivery systems can be broadly classified into two groups. viral and nonviral. Viral systems have major toxicity risks and have resulted in major complications and death in clinical trials. Nonviral systems are far less efficient than viral approaches but offer the potential to tailor applications to enhance specificity and potentially decrease toxicity. Nonviral strategies can be broadly classified as lipid-based
20 or nonlipid-based. The strategy presented in this invention can be applied to any of the existing nonviral approaches, so all will be described here.

[0004] The simplest nonviral system is direct delivery of DNA. Due to the negative charge of DNA, very little of the DNA actually enters the cell and most is degraded. Virtually none of the DNA enters the nucleus without a nuclear targeting sequence in the
25 strategy. Conventionally, another factor is employed to enhance the efficiency of gene/product delivery (DNA, RNA, or more recently protein therapeutics) either by mechanical effects such as electroporation, ultrasound, "gene gun" and direct microinjection, or by charge neutralization and chemical effects with agents such as calcium phosphate, polylysine, and liposome preparations. In the latter strategies, charge
30 neutralization has been shown to increase nonspecific efficiencies several-fold over even chemical/mechanical effects of liposome preparations alone. Based upon these and similar results, many have concluded that DNA and RNA require charge neutralization for efficiency in cellular uptake, since DNA's negative charge essentially precludes

transport except by endolysis with subsequent lysosome fusion (escaped with addition of other agents). Most transfection agents actually use an excess of positive charge in ratios of 2-4 fold over the net DNA negative charge. The resulting positive hybrid binds ionically to negatively-charged cell surface proteoglycans and dramatically enhances subsequent uptake. Some transfection agents seem to have a cellular tropism, most likely because of steric and charge patterns that more effectively target particular proteoglycans, which vary in cell-type specific patterns. Even with appropriate agents (i.e., correct tropism), charge neutralization alone or in combination with liposomes remains extremely inefficient relative to viral strategies. Thus, the community has identified a number of peptides and peptide fragments which facilitate efficient entry of a complex into a cell and past any endolysosome stage. Several such transport factors even allow efficient nuclear entry. In one process, the transport factor is directly linked to the therapeutic product of interest (small drug, gene, protein, etc). This approach requires that a new drug attached to the transport factor be produced, purified and tested. In many cases, these hybrids will actually constitute new drugs and will require full testing. Such a process results in significant additional risk and expense. Alternately, a number of strategies merely employ mixing of the agent nonspecifically (or even specifically at the surface) into liposome preparations as carriers for a drug/DNA/factor. Although an improvement over direct or simpler modalities in terms of efficiencies, these approaches remain inefficient (relative to virus) and considerably more toxic than simple nonviral strategies. Part of this inefficiency is due to poor nuclear translocation. As a result, strategies have evolved to add nuclear translocation signals to the complex detailed above, either as part of the therapeutic factor hybrid or as part of the liposome mixture. Additional refinements have included efforts to reduce DNA/RNA/factor degradation.

[0005] Perhaps the most important refinements in the basic strategies presented above have included specific ligands or other targeting agents together with the therapeutic factor. These strategies offer the potential for greatly reduced nonspecific toxicity and substantial improvements in efficiency, particularly when combined with efficiency agents described as above. However, the current strategies rely on covalent linkages to a single carrier and thus necessitate a specific synthesis (to assure that steric considerations in a degree of substitution scheme don't favor a single factor over the others—i.e., to assure that each efficiency factor and each imaging moiety, and each targeting moiety is present on the backbone). This renders virtually impossible a number of specific

constructs (for example, sialyl-lewis X and an Fab fragment to a surface antigen, since steric limitations would prevent efficient binding of one or the other in most schemes, and in turn would interfere with efficiency factors) While promising in concept, these approaches represent expensive, very low yield (in terms of synthesis), and unproven solutions to this problem

[0006] As must be evident, with each stage of development in nonviral gene and factor delivery, problems have been encountered and, in the next stage, solved with an added degree of complexity. Each improvement represented an incremental step over the prior standard. However, the added complexity brings risk from a patient-care standpoint and inefficiency and expense from a production standpoint. These barriers have led to greatly decreased enthusiasm for these otherwise promising potential therapies

[0007] What is needed are 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. Surprisingly, the present invention provides such compositions and methods

[0008] This invention further relates to formulations for transdermal delivery of proteins such as insulin, and also of larger therapeutic and diagnostic substances, for example, such substances having a molecular weight of 50,000 and higher including proteins such as botulinum toxin or other biologically active agents such as, for example, insulin, botulinum toxin, a therapeutic protein which does not therapeutically alter blood glucose levels, a nucleic acid-based agent, a non-protein non-nucleic acid therapeutic agent such as certain antifungals or alternately an agent for immunization. The invention specifically excludes antibody fragments which do not have biological activity other than only binding a specific antigen 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. Moreover, agents that have a biological activity or a therapeutic effect by binding a specific antigen, thereby blocking ligand binding or altering the conformation of the antigen are included in this invention.

[0009] Botulinum toxins (also known as botulin toxins or botulinum neurotoxins) are neurotoxins produced by the gram-positive bacteria *Clostridium botulinum*. They act to produce paralysis of muscles by preventing synaptic transmission or release of

acetylcholine across the neuromuscular junction, and are thought to act in other ways as well. Their action essentially blocks signals that normally would cause muscle spasms or contractions, resulting in paralysis or would cause glandular secretions or overexcretion such as hyperhidrosis or acne

5 [0010] Botulinum toxin is classified into eight neurotoxins that are serologically related, but distinct. Of these, seven can cause paralysis, namely botulinum neurotoxin serotypes A, B, C, D, E, F and G. Each of these is distinguished by neutralization with type-specific antibodies. Each type can be naturally-occurring, recombinant in production or engineered variants such as protein fusions. Nonetheless, the molecular
10 weight of the botulinum toxin protein molecule, for all seven of these naturally-occurring active botulinum toxin serotypes or their recombinant forms, is about 150 kD. As released by the bacterium, the botulinum toxins are complexes comprising the 150 kD botulinum toxin protein molecule in question along with associated non-toxin proteins. The botulinum toxin type A complex can be produced by *Clostridia* bacterium as 900 kD,
15 500 kD and 300 kD forms. Botulinum toxin types B and C are apparently produced as only a 700 kD or 500 kD complex. Botulinum toxin type D is produced as both 300 kD and 500 kD complexes. Botulinum toxin types E and F are produced as only approximately 300 kD complexes. The complexes (i.e. molecular weight greater than about 150 kD) are believed to contain a non-toxin hemagglutinin protein and a non-toxin
20 and non-toxic nonhemagglutinin protein. These two non-toxin proteins (which along with the botulinum toxin molecule comprise the relevant neurotoxin complex) may act to provide stability against denaturation to the botulinum toxin molecule and protection against digestive acids when toxin is ingested. Additionally, it is possible that the larger (greater than about 150 kD molecular weight) botulinum toxin complexes may result in a
25 slower rate of diffusion of the botulinum toxin away from a site of intramuscular injection of a botulinum toxin complex.

[0011] The different serotypes of botulinum toxin vary in the animal species that they affect and in the severity and duration of the paralysis they evoke. For example, it has been determined that botulinum toxin type A is 500 times more potent, as measured by
30 the rate of paralysis produced in the rat, than is botulinum toxin type B. Additionally, botulinum toxin type B has been determined to be non-toxic in primates at a dose of 480 U/kg, about 12 times the primate LD₅₀ for type A. Due to the molecule size and molecular

structure of botulinum toxin, it cannot cross stratum corneum and the multiple layers of the underlying skin architecture.

[0012] Botulinum toxin type A is said to be the most lethal natural biological agent known to man. Spores of *C. botulinum* are found in soil and can grow in improperly
5 sterilized and sealed food containers. Ingestion of the bacteria can cause botulism, which can be fatal. At the same time, the muscle-paralyzing effects of botulinum toxin have been used for therapeutic effects. Controlled administration of botulinum toxin has been used to provide muscle paralysis to treat conditions, for example, neuromuscular disorders characterized by hyperactive skeletal muscles. Conditions that have been
10 treated with botulinum toxin include hemifacial spasm, adult onset spasmodic torticollis, anal fissure, blepharospasm, cerebral palsy, cervical dystonia, migraine headaches, strabismus, temporomandibular joint disorder, and various types of muscle cramping and spasms. More recently the muscle-paralyzing effects of botulinum toxin have been taken advantage of in therapeutic and cosmetic facial applications such as treatment of
15 wrinkles, frown lines, and other results of spasms or contractions of facial muscles.

[0013] Botulism, the characteristic symptom complex from systemic botulinum toxin exposure, has existed in Europe since antiquity. In 1895, Emile P. van Ermengem first isolated the anaerobic spore-forming bacillus from raw salted pork meat obtained from post-mortem tissue of victims who died of botulism in Belgium. Van Ermengem found
20 the disease to be caused by an extracellular toxin that was produced by what he called *Bacillus botulinus* (Van Ermengem, *Z. Hyg. Infektionskr.*, 26:1-56; *Rev. Infect.* (1897)). The name was changed in 1922 to *Clostridium botulinum*. The name *Clostridium* was used to reflect the anaerobic nature of the microorganism and also its morphologic characteristics (Carruthers and Carruthers, *Can. J. Ophthalmol.*, 31:389-400 (1996)). In the
25 1920's, a crude form of Botulinum toxin type A was isolated after additional outbreaks of food poisoning. Dr. Herman Sommer at the University of California, San Francisco made the first attempts to purify the neurotoxin (Borodic et al., *Ophthalmic Plast. Reconstr. Surg.*, 7:54-60 (1991)). In 1946, Dr. Edward J. Schantz and his colleagues isolated the neurotoxin in crystalline form (Schantz et al., In: Jankovic J, Hallett M (Eds) *Therapy with Botulinum Toxin*, New York, NY: Marcel Dekker, 41-49 (1994)). By 1949, Burgen and his associates were able to demonstrate that the Botulinum toxin blocks impulses across the neuromuscular junction (Burgen et al., *J. Physiol.*, 109:10-24 (1949)). Allan B. Scott first used botulinum toxin A (BTX-A) in monkeys in 1973. Scott demonstrated reversible

ocular muscle paralysis lasting 3 months (Lamanna, Science, 130:763-772 (1959)). Soon afterwards, BTX-A was reported to be a successful treatment in humans for strabismus, blepharospasm, and spasmodic torticollis (Baron et al., In: Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM (Eds), Bailey & Scotts Diagnostic Microbiology, St. Louis, MO: Mosby Year Book, 504-523 (1994); Carruthers and Carruthers, Adv Dermatol, 12:325-348 (1997); Markowitz, In: Strickland GT (Eds) Hunters Tropical Medicine, 7th ed Philadelphia W.B Saunders, 441-444 (1991)). In 1986, Jean and Alastair Carruthers, a husband and wife team consisting of an oculoplastic surgeon and a dermatologist, began to evolve the cosmetic use of botulinum toxin-A (BTX-A) for treatment of movement-associated wrinkles in the glabella area (Schantz and Scott, In Lewis GE (Ed) Biomedical Aspects of Botulinum, New York. Academic Press, 143-150 (1981)). The Carruthers' use of BTX-A for the treatment of wrinkles led to their seminal publication of this approach in 1992 (Schantz and Scott, In Lewis GE (Ed) Biomedical Aspects of Botulinum, New York. Academic Press, 143-150 (1981)). By 1994, the same team reported experiences with other movement-associated wrinkles on the face (Scott, Ophthalmol, 87 1044-1049 (1980)). This in turn led to the birth of the era of cosmetic BTX-A treatment.

[0014] 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.

[0015] 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 melphugian 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.

[0016] 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.

[0017] 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.

[0018] 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.

[0019] 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.

[0020] Since BTX cannot penetrate the skin efficiently, in order to provide the therapeutic effects of BTX the toxin must currently be injected into the skin. The Federal Food and Drug Administration has approved such a procedure, for treatment of wrinkles, and BTX products are now marketed for this treatment. In such treatments, the botulinum toxin is administered by carefully controlled or monitored injection, creating large wells of toxin at the treatment site. However, such treatment can be uncomfortable and more typically involves some pain.

[0021] Topical application of botulinum toxin provides for a safer and more desirable treatment alternative due to painless nature of application, the larger treatment surface area that can be covered, the ability to formulate a pure toxin with higher specific activity, reduced training to apply the botulinum therapeutic, smaller doses necessary to effect, and large wells of toxin are not required in order to reach a therapeutic clinical result.

[0022] 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. One substance for which ease of administration is desired is insulin, which in many cases must still be administered by injection (including self-injection). Ease of administration would also be advantageous for larger proteins such as botulinum toxin. Other agents which do not readily cross skin but are substantially smaller than insulin or have different physiochemical properties and thus very different rates and abilities to cross skin with or without additional materials to facilitate this transfer. Further interaction of each with materials to facilitate transfer is unique for each.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0023] In one aspect, the present invention provides a composition comprising a non-covalent complex of:

- a) a positively-charged backbone; and
- b) at least two members selected from the group consisting of:

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

ii) a second negatively-charged backbone having a plurality of attached targeting agents, or alternatively a plurality of negatively-charged targeting moieties;

iii) at least one member selected from RNA, DNA, ribozymes, modified oligonucleic acids and cDNA encoding a selected transgene;

iv) DNA encoding at least one persistence factor, and

v) a third negatively-charged backbone having a plurality of attached biological agents, or a negatively-charged biological agent;

wherein the complex carries a net positive charge and at least one of the members is selected from i), ii), iii) or v).

[0024] The biological agent, in this aspect of the invention, can be either a therapeutic agent or a cosmeceutical agent. The invention specifically excludes antibody fragments which do not have biological activity other than only binding a specific antigen 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. Moreover, agents that have a biological activity or a therapeutic effect by binding a specific antigen, thereby blocking ligand binding or altering the conformation of the antigen are included in this invention. Alternatively, candidate agents can be used to determine *in vivo* efficacy in these non-covalent complexes.

[0025] 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 at least one nucleic acid member selected from the group consisting of RNA, DNA, ribozymes, modified oligonucleic acids and cDNA encoding a selected transgene.

[0026] 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.

[0027] 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 two members selected from the group consisting of:

- 5 i) a first negatively-charged backbone having a plurality of attached imaging moieties, or alternatively a plurality of negatively-charged imaging moieties;
- ii) a second negatively-charged backbone having a plurality of attached targeting agents, or alternatively a plurality of negatively-charged
- 10 targeting moieties;
- iii) at least one member selected from RNA, DNA, ribozymes, modified oligonucleic acids and cDNA encoding a selected transgene;
- iv) DNA encoding at least one persistence factor; and
- v) a third negatively-charged backbone having a plurality of
- 15 attached biological agents or cosmeceutical agents, or a negatively-charged biological agent or cosmeceutical agent;

with a pharmaceutically or cosmeceutically acceptable carrier to form a non-covalent complex having a net positive charge, with the proviso that at least one of said members is selected from i), ii), iii) or v).

[0028] 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 two components selected from groups i) through v) above, along with instructions for preparing the delivery composition.

[0029] In yet another aspect, this invention relates to a composition comprising a biologically active agent such as insulin, botulinum toxin, other proteins which do not therapeutically alter blood glucose levels, a nucleic acid-based agent, a non-protein non-nucleic acid 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. The invention specifically excludes antibody fragments which do not have biological activity other than only binding a specific antigen 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. Moreover, agents that have a biological activity or a therapeutic effect by binding a specific antigen, thereby blocking ligand binding or altering the conformation of the antigen are included in this invention.

- 5 The biologically active agent is preferably insulin, botulinum toxin (BTX), an antigen for immunization, or certain antifungal agents. Suitable antifungal agents include, for example, amphotericin B, fluconazole, flucytosine, itraconazole, ketoconazole, clotrimazole, econazole, griseofulvin, miconazole, nystatin, ciclopirox and the like. Most preferably the positively charged carrier is a comparatively short- or medium-chain
- 10 positively charged polypeptide or a positively charged nonpeptidyl polymer, for example, a polyalkyleneimine. When the biologically active agent is botulinum toxin, the invention further relates to a method for producing a biologic effect such as muscle paralysis, reducing hypersecretion or sweating, treating neurologic pain or migraine headache, reducing muscle spasms, preventing or reducing acne, or reducing or
- 15 enhancing an immune response, by topically applying a composition containing an effective amount of botulinum toxin, preferably to the skin, of a subject or patient in need of such treatment. The invention also relates to a method for producing an aesthetic and/or cosmetic effect, for example by topical application of botulinum toxin to the face instead of by injection into facial muscles. When the biologically active agent is insulin,
- 20 the invention relates to a method of transdermally delivering insulin to a subject by applying to the skin or epithelium of the subject an effective amount of such a composition containing insulin, or a combination of insulin and the positively charged backbone. Proteins 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
- 25 invention and that do not have a therapeutic effect on lowering blood glucose have widely differing surface and physiochemical properties from insulin that normally would make it uncertain whether a technique that afforded transdermal delivery of insulin would have positive results for any other proteins. However, carriers of this invention that have a positively charged backbone with positively charged branching groups, as described
- 30 herein are quite surprisingly capable of providing transdermal delivery of such other proteins, including, for example botulinum toxin. 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 large protein having a molecular weight over 50,000 kD or under 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. 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. In certain aspects of the invention, transdermal delivery of therapeutic proteins capable of achieving therapeutic alterations of blood glucose are specifically excluded. 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-nucleic acid agents or hybrids thereof. Nucleic acids 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 agents preferably include, for example, antigens related to botulism, 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.

[0030] The positively charged carriers or backbones with their positively charged branching groups, as described herein, are themselves novel compounds, and form another aspect of this invention.

[0031] 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, the polypeptide or nonpeptidyl polymer having positively charged branching or "efficiency" groups as defined herein, with a biologically active agent such as, for example, insulin, botulinum toxin, a therapeutic protein which does not therapeutically alter blood glucose levels, a nucleic acid-based agent, a non-protein non-nucleic acid therapeutic agent such as certain antifungals or alternately an agent for immunization. The invention also provides a kit for preparing or formulating such a composition that comprises the carrier and the 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 and methods of

the present invention. As used herein, "device" can refer for example to an instrument or applicator for delivery or for mixing or other preparation technique to form or apply the compositions and methods of the present invention

[0032] This invention also comprises devices for transdermal transmission of a
5 biologically active agent such as, for example, insulin, botulinum toxin, a therapeutic protein which does not therapeutically alter blood glucose levels, a nucleic acid-based agent, a non-protein non-nucleic acid therapeutic agent such as certain antifungals or alternately an agent for immunization that is contained within a composition that, in turn, in one embodiment, comprises a carrier comprising a positively charged polypeptide of
10 preferably short chain to intermediate chain length or a longer-chain nonpeptidyl polymeric carrier that has positively charged branching or "efficiency" groups as defined herein, and a therapeutic agent as just mentioned. Such devices may be as simple in construction as a skin patch, or may be a more complicated device that includes means for dispensing and monitoring the dispensing of the composition, and optionally means for
15 monitoring the condition of the subject in one or more aspects, including monitoring the reaction of the subject to the substances being dispensed. 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.

[0033] Alternatively the device may contain only the therapeutic biologically active agent for example, insulin, botulinum toxin, a therapeutic protein which does not therapeutically alter blood glucose levels, a nucleic acid-based agent, a non-protein non-nucleic acid therapeutic agent such as certain antifungals or alternately an agent for immunization, and the carrier may be applied separately to the skin. Accordingly, the
25 invention also comprises a kit that includes both a device for dispensing via the skin and a material that contains the positively charged carrier or backbone, and that is suitable for applying to the skin or epithelium of a subject.

[0034] In general, the invention also comprises a method for administering a biologically active agent such as, for example, insulin, botulinum toxin, a therapeutic
30 protein which does not therapeutically alter blood glucose levels, a nucleic acid-based agent, a non-protein non-nucleic acid therapeutic agent such as certain antifungals or alternately an agent for immunization to a subject or patient in need thereof, comprising

topically administering an effective amount of said 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. By "in conjunction with" is meant that the two components - biologically active agent and positively charged carrier - 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.

[0035] The invention also relates to methods of applying biologically active agents such as, for example, insulin, botulinum toxin, a therapeutic protein which does not therapeutically alter blood glucose levels, a nucleic acid-based agent, a non-protein non-nucleic acid therapeutic agent such as certain antifungals or alternately an agent for immunization as defined herein to epithelial cells, including those other than epithelial skin cells, for example, epithelia ophthalmic cells or cells of the gastrointestinal system.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0036] Figure 1 provides a schematic representation the components used in the invention

5 [0037] Figure 2 provides a schematic representation of several embodiments of the invention.

[0038] 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.

10 [0039] Figure 5 represents the results of transdermal delivery of a plasmid containing the transgene for E. coli beta-galactosidase as described in Example 3.

[0040] Figure 6 represents the results of transdermal delivery of a plasmid containing the transgene for E. coli beta-galactosidase as described in Example 4.

[0041] Figure 7 represents the results of transdermal delivery of a botulinum toxin as described in Example 5

15 [0042] Figure 8 is a photographic depiction of the results of transdermal delivery of a botulinum toxin as described in Example 6

20 [0043] 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).

DESCRIPTION OF THE INVENTION

General

25 [0044] The present invention provides a component-based system for selective, persistent, delivery of imaging agents, genes 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 on separate negatively charged backbones which will form a non-
30 covalent ionic complex with a positive backbone. By placing these components on a

negatively charged backbone, the invention obviates the need for attaching components in precise locations on a positive backbone as employed in other strategies (increasing complexity and expense and decreasing efficiency to a level that no successful combination has yet been reported due to steric limitations)

5 [0045] In another aspect, 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 have 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
10 determined for example by change in particle sizing or functional spectrophotometry versus the components alone.

[0046] 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
15 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) a short negatively charged backbone having attached imaging moieties (open triangles attached to a light bar), (3) a short negatively charged backbone having attached targeting agents and/or therapeutic agents (open circles
20 attached to a light bar); (4) an oligonucleic acid, RNA, DNA or cDNA (light cross hatched bar), and (5) DNA encoding persistence factors (dark cross hatched bar). 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
25 imaging component, a targeting component, an oligonucleic acid and a persistence factor.

[0047] 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 imaging components and targeting components. Finally, a third multi-component system is illustrated which is useful for gene delivery. In this system, a
30 complex is formed between a positively charged backbone, a targeting component, a gene of interest and DNA encoding a persistence factor. The present invention, described

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

Description of the Embodiments

5

Compositions

[0048] In view of the above, the present invention provides in one aspect a composition comprising a non-covalent complex of

- a) a positively-charged backbone; and
 - 10 b) at least two members selected from the group consisting of:
 - i) a first negatively-charged backbone having a plurality of attached imaging moieties; or alternatively a plurality of negatively-charged imaging moieties,
 - 15 ii) a second negatively-charged backbone having a plurality of attached targeting agents; or alternatively a plurality of negatively-charged targeting moieties,
 - iii) at least one member selected from RNA, DNA, ribozymes, modified oligonucleic acids and cDNA encoding a selected transgene,
 - iv) DNA encoding at least one persistence factor; and
 - 20 v) a third negatively-charged backbone having a plurality of attached biological agents, or a negatively-charged biological agent,
- wherein the complex carries a net positive charge and at least one of the members is selected from i), ii) iii) or v).

- 25 [0049] In one group of embodiments, the composition comprises at least three members selected from groups i) through v). In another group of embodiments, the composition comprises at least one member from each of groups i), ii), iii) and iv). In yet another group of embodiments, the composition comprises at least one member from each of groups i) and ii). In another group of embodiments, the composition comprises at least
- 30 one member from each of groups ii), iii) and iv).

[0050] 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

[0051] By "positively charged" 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 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 are 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 which do not have biological activity other than only binding a specific antigen 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. Moreover, agents that have a biological activity or a therapeutic effect by binding a specific antigen, thereby blocking ligand binding or altering the conformation of the antigen are included in this invention.

[0052] In another embodiment, the present invention provides in one aspect a composition comprising a biologically active agent such as, for example, insulin, botulinum toxin, a therapeutic protein which does not therapeutically alter blood glucose

levels, a nucleic acid-based agent, a non-protein non-nucleic acid therapeutic agent such as certain antifungals or alternately an agent for immunization and a carrier comprising a positively charged backbone, 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 having positively charged branching or "efficiency" groups as defined herein. Each protein-based therapeutic and non-nucleic acid non-protein therapeutic has distinct physiochemical properties which alter total complex characteristics. Such positively charged carriers are among the materials described below as positively charged backbones. The invention also provides a method for administering a therapeutically effective amount of a biologically active agent as mentioned herein, 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 biologically active agent to the subject. In that method, the biologically active agent 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 agent 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). 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. In certain aspects of the invention, transdermal delivery of therapeutic proteins capable of achieving therapeutic alterations of blood glucose is specifically excluded. The invention specifically excludes antibody fragments which do not have biological activity other than only binding a specific antigen 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. Moreover, agents that have a biological activity or a therapeutic effect by binding a specific antigen, thereby blocking ligand binding or altering the conformation of the antigen are included in this invention. 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-nucleic acid agents or hybrids thereof. Nucleic acids 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 agents preferably include, for example, antigens related to botulism, 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

Positively charged backbone

[0053] 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 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). 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 homo-polymer, 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, which can include, for example, ionic interactions, hydrogen bonding, van der Waals forces, or combinations thereof.

[0054] 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

[0055] 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.* 4:80 (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

[0056] 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 thioamides (-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 (-NH₂SO₂-), 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.

[0057] 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 -NH-SO₂-) 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.

[0058] In a particularly preferred embodiment, the positively charged backbone is a polypeptide having branching groups (also referred to as efficiency groups) independently selected from -(gly)_{n1}-(arg)_{n2}, HIV-TAT or fragments thereof, or the protein transduction domain of Antennapedia, or a fragment or mixture 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 %.

[0059] 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 appropriate selection of a 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 (-Gly₃Arg₇) or HIV-TAT. In another preferred embodiment the positively charged backbone is a long chain polyalkyleneimine such as a polyethyleneimine, for example, one having a molecular weight of about 1,000,000.

[0060] The positively charged backbones or carrier molecules comprising polypeptides or nonpeptidyl polymers such as polyalkyleneimines and other positively charged backbones mentioned above, having the branching groups described above, are novel compounds and form an aspect of this invention.

[0061] 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. 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 of this case 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 -(gly)_{n1}-(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 $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$, or $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$, wherein the subscripts p and q are each independently an integer of from 0 to 20 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).

[0062] 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, $-\text{gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg}$ ($-\text{Gly}_3\text{Arg}_7$), HIV-TAT or fragments of it, and Antennapedia PTD or fragments thereof.

Other components

[0063] In addition to the positively charged backbone component, the multicomponent compositions of the present invention comprise at least two components from the group consisting of the following:

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

ii) a second negatively-charged backbone having a plurality of attached targeting agents; or alternatively a plurality of negatively-charged targeting moieties,

iii) at least one member selected from RNA, DNA, ribozymes, modified oligonucleic acids and cDNA encoding a selected transgene;

iv) DNA encoding at least one persistence factor; and

v) a third negatively-charged backbone having a plurality of attached biological agents, or a negatively-charged biological agent.

10 [0064] 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 insulin, botulinum toxin, proteins which do not therapeutically alter blood glucose levels, antigens suitable for
15 immunization, or non-protein non-nucleic acid agents, can also be employed in these compositions.

[0065] 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
20 Alternately, the imaging moieties, targeting moieties and therapeutic agents with sufficient surface negatively charged moieties will not require attachment of an additional backbone for ionic complex 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
25 moieties or therapeutic agents to afford an ionic bond with the positively-charged backbones described above. In these cases, the substance or a derivative thereof have sufficient negative charge to associate with the positively charged carriers of the present invention non-covalently. The term "sufficient" in this context can be determined for example by a change in particle sizing or functional spectrophotometry versus the
30 components alone. Suitable negatively-charged groups are carboxylic acids, phosphinic, phosphonic or phosphoric acids, sulfinic or sulfonic acids, and the like. In some embodiments, the negatively-charged backbone will be an oligonucleotide. 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

Alternately, the imaging moieties and targeting moieties can themselves be small anions in the absence of a negatively charged polymer. Alternately, the imaging moieties, targeting moieties and therapeutic agents can be themselves covalently modified to afford sufficient surface negatively charged moieties for ionic complex 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 have 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.

Imaging moieties

[0066] 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 and device used for detection of the agent, and the like.

[0067] 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 triaminepentaacetic 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), hydroxybenzylethylenediamine 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 the group consisting of 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.

[0068] Other examples of diagnostic agents include marker genes that encode proteins that are readily detectable when expressed in a cell, including, but not limited to, β -galactosidase, green fluorescent protein, blue fluorescent protein, luciferase, and the like. A wide variety of labels may be employed, such as radionuclides, fluorophores, 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.

[0069] 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 above to retain a complex with the positively-charged carrier. Other imaging agents carry sufficient negative charge to retain complex with the positively-charged carrier, even in the absence of a negatively-charged backbone. In these cases, the substance or a derivative thereof have 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. Examples of such negatively-charged imaging moieties include phosphate ion (useful for magnetic resonance imaging).

Targeting agents

[0070] 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. In certain embodiments, the targeting agents and the imaging moieties are structurally and/or chemically distinct. For example, the imaging moieties and targeting agents are both not phosphate. Generally, the targeting agents can be any element that makes it possible to direct the transfer of a nucleic acid, 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, which allows, for example, a nucleic acid transfer to be directed towards certain types of cells or certain desired tissues (tumor cells, liver cells, hematopoietic cells, and the like). 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 also be a small anion which, by virtue of changing 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.

[0071] 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 an oligonucleic acid, polyaspartate, sulfated or phosphorylated dextran and the like that serves as a negatively-charged backbone component, preferably via a linking group. Methods of attaching targeting agents (as well as other biological agents) to nucleic acids are well known to those of skill in the art using, for example, heterobifunctional linking groups (see Pierce Chemical Catalog). In one group of embodiments, the targeting agent is a fusogenic peptide for promoting cellular transfection, that is to say 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, insulin or asialo-orosomucoid protein.

Such a ligand may also be one of intracellular type, such as a nuclear location signal (nls) sequence which promotes the accumulation of transfected DNA within the nucleus.

[0072] Other targeting agents useful in the context of the invention, include sugars, peptides, hormones, vitamins, cytokines, oligonucleic acids, 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 such as antibodies or antibody fragments, 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, or alternatively an antibody Fab fragment which makes it possible to target the Fc fragment receptor of immunoglobulins.

[0073] 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 retain an ionic complex with the positively-charged carrier described above. In these cases, the substance or a derivative thereof have 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 including for example phosphate, aspartate and citrate which can for example change targeting based upon net surface charge of the cell to be targeted.

[0074] In the compositions of the present invention, the nucleic acid can be either a deoxyribonucleic acid or a ribonucleic acid, and can comprise sequences of natural or artificial origin. More particularly, the nucleic acids used herein can include genomic DNA, cDNA, mRNA, tRNA, rRNA, hybrid sequences or synthetic or semi-synthetic sequences. These nucleic acids can be of human, animal, plant, bacterial, viral, etc. origin. Additionally, the nucleic acids can be obtained by any technique known to those

skilled in the art, and in particular by the screening of banks, by chemical synthesis or by mixed methods including the chemical or enzymatic modification of sequences obtained by the screening of banks. Still further, the nucleic acids can be incorporated into vectors, such as plasmid vectors.

- 5 [0075] The deoxyribonucleic acids used in the present invention can be single- or double-stranded. These deoxyribonucleic acids can also code for therapeutic genes, sequences for regulating transcription or replication, antisense sequences, regions for binding to other cell components, etc. Suitable therapeutic genes are essentially any gene which codes for a protein product having a therapeutic effect. The protein product thus
- 10 encoded may be a protein, polypeptide, a peptide, or the like. The protein product can, in some instances, be homologous with respect to the target cell (that is to say a product which is normally expressed in the target cell when the latter exhibits no pathology). In this manner, the use of suitable nucleic acids can increase the expression of a protein, making it possible, for example, to overcome an insufficient expression in the cell.
- 15 Alternatively, the present invention provides compositions and methods for the expression of a protein which is inactive or weakly active due to a modification, or alternatively of overexpressing the protein. The therapeutic gene may thus code for a mutant of a cell protein, having increased stability, modified activity, etc. The protein product may also be heterologous with respect to the target cell. In this case, an
- 20 expressed protein may, for example, make up or provide an activity which is deficient in the cell, enabling it to combat a pathology or to stimulate an immune response.

- [0076] More particularly, nucleic acids useful in the present invention are those that code for enzymes, blood derivatives, hormones, lymphokines, interleukins, interferons, TNF, growth factors, neurotransmitters or their precursors or synthetic enzymes, or
- 25 trophic factors: BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, VEGF, NT3, NT5, HARP/pleiotrophin; the proteins involved in the metabolism of lipids, of apolipoprotein-types selected from apolipoproteins A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E, F, G, H, J and apo(a), metabolic enzymes such as, for example, lipoprotein lipase, hepatic lipase, lecithin cholesterol acyltransferase, 7- α -cholesterol hydroxylase, phosphatidic acid
- 30 phosphatase, or lipid transfer proteins such as cholesterol ester transfer protein and phospholipid transfer protein, a protein for binding HDLs or a receptor selected from, for example, LDL receptors, chylomicron-remnant receptors and scavenger receptors, dystrophin or minidystrophin, GAX protein, CFTR protein associated with

mucoviscidosis, tumor-suppressant genes: p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev; protein factors involved in coagulation: factors VII, VIII, IX; or the nucleic acids can be those genes involved in DNA repair, suicide genes (thymidine kinase, cytosine deaminase), genes encoding thrombomodulin, α 1-antitrypsin, tissue plasminogen activator, superoxide
5 dismutase, elastase, matrix metalloproteinase, and the like.

[0077] The therapeutic genes useful in the present invention can also be an antisense sequence or a gene whose expression in the target cell makes it possible to control the expression of genes or the transcription of cellular mRNA. Such sequences can, for example, be transcribed in the target cell into complementary RNA of cellular mRNA and
10 thus block their translation into protein, according to the technique described in patent EP 140,308. The antisense sequences also comprise the sequences coding for ribozymes which are capable of selectively destroying target RNA (see EP 321,201).

[0078] As indicated above, the biologically active agent may also comprise one or more antigenic peptides that are capable of generating an immune response in humans or
15 animals. In this particular embodiment, the invention thus makes it possible to produce either vaccines or immunotherapeutic treatments applied to humans or to animals, in particular against microorganisms, viruses or cancers. They may in particular be antigenic peptides specific for Epstein-Barr virus, for HIV virus, for hepatitis B virus (see EP 185,573), for pseudo-rabies virus or alternatively specific for tumors (see EP
20 259,212).

[0079] Preferably, the nucleic acid also comprises sequences that allow the expression of the therapeutic gene and/or of the gene coding for the antigenic peptide in the desired cell or organ. These can be sequences that are naturally responsible for expression of the gene considered when these sequences are capable of functioning in the infected cell.
25 The nucleic acids can also be sequences of different origin (responsible for the expression of other proteins, or even synthetic proteins). In particular, the nucleic acids can contain promoter sequences for eukaryotic or viral genes. For example, the promoter sequences can be those derived from the genome of the cell which it is desired to infect. Similarly, the promoter sequences can be derived from the genome of a virus, e.g., the promoters of
30 genes ELA, MLP, CMV, RSV, etc. In addition, these expression sequences may be modified by addition of activation sequences, regulation sequences, etc.

[0080] Moreover, the nucleic acid may also contain, in particular upstream of the therapeutic gene, a signal sequence which directs the therapeutic product synthesized into the secretion pathways of the target cell. This signal sequence may be the natural signal sequence of the therapeutic product, but it may also be any other functional signal sequence, or an artificial signal sequence.

DNA encoding at least one persistence factor

[0081] In some embodiments, the composition will also comprise DNA encoding at least one persistence factor. Exemplary of such DNA is the DNA encoding adenoviral preterminal protein 1 (see, Lieber, et al. *Nature Biotechnology* 15(13):1383-1387 (1997). Adenoviral preterminal protein 1 or the nucleic acid encoding it can be provided in cis- or trans- to the nucleic acid sequence encoding the desired therapeutic transgene. When provided in this manner, the preterminal protein 1 or sequence preserves the therapeutic nucleic acid as a stable nuclear episome and thus prevents loss of the therapeutic nucleic acid and prevents late decreases in therapeutic protein expression.

Biological agents

[0082] A variety of biological 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.

[0083] 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. Alternately, sufficient negatively charged groups can be introduced into the therapeutic agent to afford

ionic complex 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.

[0084] 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 have 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.

[0085] Suitable cosmeceutic agents include, for example, epidermal growth factor (EGF), as well as human growth hormone, antioxidants, and botulinum toxin. In the context of this invention, the term "botulinum toxin" includes not only botulinum serotypes A, B, C, D, E, F, and G, but also fragments thereof having botulinum light-chain activity.

[0086] 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, terbutyline, 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, and botulinum toxin (BTX); 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 propanolol, 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, phenesterne, 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 insulin, growth hormone, prolactin, EGF (epidermal growth factor) and the like, immunosuppressive agents such as cyclosporine, azathioprine, mizorobine, FK506, prednisone and the like; angiogenic agents such as VEGF (vascular endothelial growth factor); 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).

[0087] In the most preferred embodiments, the biological agent is selected from insulin, botulinum toxin, VEGF, antigens for immunization, and antifungal agents.

[0088] 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 retain complex with the positively-charged carrier. Examples include botulinum toxin (a large MW protein), insulin (a small MW protein), antigens for immunization, which can range from very small to very large and typically include proteins or glycoproteins, and many antifungal agents. In these cases, the substance or a derivative thereof has a 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.

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

[0089] For three of the above groups of components, including imaging moieties, targeting agents and therapeutic agents, the individual compounds can be attached to a negatively charged backbone, covalently modified to introduce negatively-charged
10 moieties, or employed directly if the compound contains sufficient negatively-charged moieties to confer ionic binding 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
15 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).

[0090] In some embodiments, the therapeutic, diagnostic or targeting agents will not
20 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.

[0091] In yet another aspect, the present invention provides compositions comprising a
25 non-covalent complex of a positively-charged backbone having at least one attached efficiency group and at least one nucleic acid member selected from the group consisting of RNA, DNA, ribozymes, modified oligonucleic acids and cDNA encoding a selected transgene. In this aspect of the invention, the positively-charged backbone can be essentially any of the positively-charged backbones described above, and will also
30 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. Additionally, the nucleic acids useful in this aspect of the invention are the same as have been described above.

Transdermal delivery of insulin and certain larger molecules

5 [0092] It has been found that the positively charged carriers above can be used for transdermal delivery of insulin and certain other biologically active agents which do not therapeutically alter blood glucose levels, such as proteins having a molecular weight of about 50,000 and above, for instance, botulinum toxin (BTX), or for other biologically active agents such as a therapeutic nucleic acid-based agent, a non-protein non-nucleic acid therapeutic agent such as certain antifungal agents or alternately an agent for immunization. The use of the positively charged carrier enables transmittal 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. For example, insulin may be delivered through the skin into underlying capillaries for transport through the body without the need for injection. Botulinum toxin can be delivered to muscles underlying or glandular structures within the skin in an effective amount to produce paralysis, produce relaxation, alleviate contractions, prevent or alleviate spasms, reduce glandular output or provide other desired effects. 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 botulinum toxin. This embodiment may include a quantity of a small preferably polyvalent anion, for example, phosphate, aspartate, or citrate, or may be carried out in the substantial absence of such a polyanion. 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.

[0093] The term "botulinum toxin" as used herein is meant to refer to any of the known serotypes of botulinum toxin, whether produced by the bacterium or by recombinant techniques, as well as any such types that may be subsequently discovered including engineered variants or fusion proteins. As mentioned above, at the present time, seven immunologically distinct botulinum neurotoxins have been characterized, namely botulinum neurotoxin serotypes A, B, C, D, E, F and G, each of which is distinguished by neutralization with type-specific antibodies. The botulinum toxin serotypes are available from Sigma-Aldrich and from Metabionics, Inc. (Madison, Wisconsin), as well as from

other sources. The different serotypes of botulinum toxin vary in the animal species that they affect and in the severity and duration of the paralysis they evoke. At least two types of botulinum toxin, types A and B, are currently available commercially in formulations for treatment of certain conditions. Type A, for example, is contained in preparations of
5 Allergan having the trademark BOTOX® and of Ipsen having the trademark DYSPORT®, and type B is contained in preparations of Elan having the trademark MYOBLOC®.

[0094] The botulinum toxin used in the compositions of this invention can be a botulinum toxin derivative, that is, a compound that has botulinum toxin activity but
10 contains one or more chemical or functional alterations on any part or on any chain relative to naturally occurring or recombinant native botulinum toxins. For instance, the botulinum toxin may be a modified neurotoxin, that is a neurotoxin which has at least one of its amino acids deleted, modified or replaced, as compared to a native, or the modified neurotoxin can be a recombinant produced neurotoxin or a derivative or fragment thereof.
15 For instance, the botulinum toxin may be one that has been modified in a way that, for instance, enhances its properties or decreases undesirable side effects, but that still retains the desired botulinum toxin activity. The botulinum toxin may be any of the botulinum toxin complexes produced by the bacterium, as described above. Alternatively the botulinum toxin may be a toxin prepared using recombinant or synthetic chemical
20 techniques, e.g. a recombinant peptide, a fusion protein, or a hybrid neurotoxin, for example prepared from subunits or domains of different botulinum toxin serotypes (see U.S. patent 6,444,209, for instance). The botulinum toxin may also be a portion of the overall molecule that has been shown to possess the necessary botulinum toxin activity, and in such case may be used per se or as part of a combination or complex molecule, for
25 instance a fusion protein. Alternately, a portion of the toxin may be used directly with the positively charged backbones described herein with or without targeting moieties since the positively charged backbone allows cellular internalization even in the absence of the native BTX binding, targeting, or internalization domains. Alternatively, the botulinum toxin may be in the form of a botulinum toxin precursor, which may itself be non-toxic,
30 for instance a nontoxic zinc protease that becomes toxic on proteolytic cleavage.

[0095] This invention also contemplates the general use of combinations and mixtures of botulinum toxins, though due to their differing nature and properties, mixtures of botulinum toxin serotypes are not generally administered at this time.

- [0096] Similarly, the term "insulin" includes insulin extracted from natural sources, as well as insulin that may be obtained synthetically, via chemical or recombinant means. The insulin also may be in a modified form, or in the form of, e.g. a recombinant peptide, a fusion protein, or a hybrid molecule, or the insulin in a particular case may be a portion of the insulin molecule that possesses the necessary activity. The same is true of other proteins that may be used in these particular transdermal compositions and methods, particularly antigens for immunization, which can vary widely in physiochemical properties. Likewise non-protein non-nucleic acid therapeutic agents, including antifungal agents, may be obtained from natural sources or may be synthesized
- 10 [0097] 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 botulinum toxin compositions may also be used, for
- 15 example, for altering or improving the appearance of facial tissue
- [0098] Through the use of the positively charged carriers of this invention, a botulinum toxin can be administered transdermally to a subject for treating conditions such as undesirable facial muscle or other muscular spasms, hyperhidrosis, acne, or conditions elsewhere in the body in which relief of muscular ache or spasms is desired. The
- 20 botulinum toxin is administered topically for transdermal delivery to muscles or to other skin-associated structures. The administration may be made, for example, to the legs, shoulders, back including lower back, axilla, palms, feet, neck, groin, dorsa of the hands or feet, elbows, upper arms, knees, upper legs, buttocks, torso, pelvis, or any other part of the body where administration of the botulinum toxin is desired.
- 25 [0099] Administration of botulinum toxin may also be carried out to treat other conditions, including treating of neurologic pain, prevention or reduction of migraine headache or other headache pain, prevention or reduction of acne, prevention or reduction of dystonia or dystonic contractions whether subjective or clinical, prevention or reduction of symptoms associated with subjective or clinical hyperhidrosis, reducing
- 30 hypersecretion or sweating, reducing or enhancing immune response, or treatment of other conditions for which administration of botulinum toxin by injection has been suggested or performed. Administration of botulinum toxin, other therapeutic proteins

which do not have a therapeutic effect on blood glucose levels, other antigens useful for immunization described herein, or other non-nucleic acid non-protein therapeutic agents for instance, the complexed botulinum toxin, may also be carried out for immunization-related purposes. Alternately, the complex can be prepared and applied topically to enhance an immune response, for example to provide immunizations respecting various proteins, for example, for childhood immunizations without injections or immunization against various environmental hazards. Surprisingly, administration of botulinum toxin or other therapeutic proteins, described herein may also be carried out to reduce immune responses. The present invention allows BTX and other protein to be delivered by an altered route of administration and changes the complex antigen presentation of the agent and may thus be useful to reduce immune response to antigens to that protein, and thus facilitate repeat administration without immune-related reduction in activity.

[0100] In general, the compositions are prepared by mixing the insulin, botulinum toxin, or other biologically active agent such as for example, a therapeutic protein which does not therapeutically alter blood glucose levels, a therapeutic nucleic acid-based agent, a non-protein non-nucleic acid 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, that is, 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 so described 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.

[0101] 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 botulinum toxin or other therapeutic protein and the positively charged backbone or carrier may be administered in
5 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
10 or other device

[0102] The compositions of the invention are applied so as to administer an effective amount of the insulin, botulinum toxin, or other beneficial substance. 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
15 absence of the carrier. For botulinum toxin, the term "effective amount" as used herein means an amount of a botulinum toxin as defined above that is sufficient to produce the desired muscular paralysis or other effect, but that implicitly is a safe amount, i.e. one that is low enough to avoid serious side effects. Desired effects include the relaxation of certain muscles with the aim of, for instance, decreasing the appearance of fine lines
20 and/or wrinkles, especially in the face, or adjusting facial appearance in other ways such as widening the eyes, lifting the corners of the mouth, or smoothing lines that fan out from the upper lip, or the general relief of muscular tension. The last-mentioned effect, general relief of muscular tension, can be accomplished in the face or elsewhere, for example in the back or legs. For insulin, the term "effective amount" similarly means an
25 amount of insulin that is sufficient to produce the desired effect, namely decrease of glucose in the patient or subject's blood. 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.
30 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 which do not have biological activity other than only binding a specific antigen 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. Moreover, agents that have a biological activity or a therapeutic effect by binding a specific antigen, thereby blocking ligand binding or altering the conformation of the antigen are included in this invention.

[0103] The compositions may contain an appropriate effective amount of the insulin, botulinum toxin, or other biologically active agent such as for example, a therapeutic protein which does not therapeutically alter blood glucose levels, a therapeutic nucleic acid-based agent, a non-protein non-nucleic acid therapeutic agent or alternately an agent for immunization, 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 botulinum toxin or other biologically active agent such as for example, a therapeutic protein which does not therapeutically alter blood glucose levels or a therapeutic nucleic acid-based agent 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-nucleic acid 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. In general, in a form suitable for application to the subject, the compositions of the invention will contain from about 0.001 to about 10,000 preferably from about 0.01 to about 1,000 IU/g of a composition comprising botulinum toxin and a positively charged carrier molecule as described herein. The ratio of carrier : botulinum toxin preferably ranges from about 10:1 to about 1.01:1 and more preferably from about 6:1 to about 1.5:1 respectively. The amount of carrier molecule or the ratio of it to the botulinum toxin 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.

[0104] The compositions of this invention allow for the delivery of a more pure botulinum toxin with higher specific activity potentially improved pharmacokinetics. In addition, the positively charged carrier reduces the need for foreign accessory proteins

(e.g., human serum albumin ranging from 400-600 mg or recombinant serum albumin ranging from 250-500 mg) and polysaccharide stabilizers and can afford beneficial reductions in immune responses to the BTX. In addition, the compositions are suitable for use in physiologic environments with pH ranging from 4.5 to 6.3, and may thus have such a pH. The compositions may be stored preferably either at room temperature or under refrigerated conditions.

[0105] The botulinum toxin-containing compositions or devices will generally be applied so as to provide the botulinum toxin at a dose of from about 1U to about 20,000U, preferably from about 1 U to about 10,000U, of botulinum toxin per cm² of skin, per application. Higher dosages within these ranges could preferably be employed in conjunction with controlled release materials, for instance, or allowed a shorter dwell time on the skin prior to removal.

[0106] In the case of insulin, the compositions of the invention will contain from about 0.011U to about 5000U, preferably from about 0.1U to about 500U /gram. A composition comprising a form of insulin and a positively charged carrier molecule as described herein preferably ranges from about 30:1 to about 1.01:1 and more preferably from about 6:1 to about 1.25:1 of insulin:carrier, respectively. Likewise, the amount of carrier molecule or the ratio of it to the insulin will depend on which carrier is chosen for use in the composition in question.

[0107] In terms of their form, 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 the botulinum toxin, insulin or other biologically active agent, 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 actives, botanical extracts, conditioning agents, darkening or lightening agents, glitter, humectants, mica, minerals, polyphenols, silicones or derivatives thereof, sunblocks, vitamins, and phytomedicinals. 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

[0108] Compositions according to this invention may be in the form of controlled-release or sustained-release compositions, wherein the insulin, botulinum toxin, or other 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 is 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).

[0109] Administration of the compositions of this invention to a subject is, of course, another aspect of the invention. In the case of botulinum toxin, 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 botulinum toxin for the purposes mentioned above, a composition as described above is applied topically to the skin at a location or locations where the effect is desired. Because of its nature, most preferably the amount of botulinum toxin applied should be applied with care, at an application rate and frequency of application that will produce the desired result without producing any adverse or undesired results.

[0110] In the case of insulin, for hospitalized patients or in-office treatments, the administration will be carried out by or under the direction of a health care professional, but otherwise is likely to be performed by the patient. Administration by skin patches and the like, with controlled release and/or monitoring is likely to be a common method, so the insulin-containing compositions 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. Accordingly, sustained release compositions are also contemplated by this invention. 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. In the case of non-protein, non-nucleic acid 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. Sustained release compositions are also contemplated for non-protein, non-nucleic acid therapeutics. Antifungal agents may be administered to the finger nail or toe nail plate or surrounding anatomic structures using, for instance, a prosthetic nail plate, a lacquer, a nail polish with a color agent, a gel, or a combination of any or all of these. For transdermal delivery of botulinum toxin for the purposes mentioned above, a composition as described above is applied topically to the skin

[0111] 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. The term "custom applicator" is meant to include the means just mentioned for administering antifungal agents.

[0112] 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 insulin, botulinum toxin, antigens suitable for immunization, antifungal agents or other biologically active agent such as for example, a therapeutic protein which does not therapeutically alter blood glucose levels, a therapeutic nucleic acid-based agent, or a non-protein non-nucleic acid therapeutic agent, in general. 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 or biologically active 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, thus, the two substances, specifically carrier and biologically active agent, act in combination or in conjunction, or perhaps interact to form a composition or combination in situ.

Methods of Preparing the Compositions

[0113] 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 two members selected from the group consisting of:

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

ii) a second negatively-charged backbone having a plurality of attached targeting agents, or alternatively a plurality of negatively-charged targeting moieties;

iii) at least one member selected from RNA, DNA, ribozymes, modified oligonucleic acids and cDNA encoding a selected transgene;

iv) DNA encoding at least one persistence factor; and

v) a third negatively-charged backbone having a plurality of attached biological agents, or a negatively-charged biological agent;

with a pharmaceutically acceptable carrier to form a non-covalent complex having a net positive charge, with the proviso that at least one of the members is selected from i), ii), iii) or v).

[0114] 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. Here preferred are compositions and methods comprising a biologically active agent such as a botulinum toxin or other therapeutic protein which does not lower blood glucose 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 positively charged carrier. Also preferred are compositions and methods comprising a non-nucleic acid non-protein therapeutic such as an antifungal agent or an antigen suitable for immunization containing 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. 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.

[0115] 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., DNA, 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.

[0116] The compositions can be formulated to provide mixtures suitable for topical, cutaneous, oral, rectal, vaginal, parenteral, intranasal, intravenous, intramuscular, subcutaneous, intraocular, transdermal, etc. administration. 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). They may in particular be sterile, isotonic solutions or dry compositions, in particular freeze-dried compositions, which, by addition, depending on the case, of sterilized water or of physiological saline, allow injectable solutions to be made up. For example, the doses of nucleic acid used for the injection and the number of administrations may be adapted according to various parameters, and in particular according to the mode of administration used, the pathology concerned, the gene to be expressed, or alternatively the desired duration of the treatment.

[0117] 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 CompositionsDelivery methods

5 [0118] 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, and, 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).

[0119] 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)*).

[0120] The formulations can take the form of solid, semi-solid, lyophilized power, or liquid dosage forms, such as, for example, tablets, pills, capsules, powders, solutions, suspensions, emulsions, suppositories, retention enemas, creams, ointments, lotions, gels, 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. The invention specifically excludes antibody fragments which do not have biological activity other than only binding a specific antigen 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. Moreover, agents that have a biological activity or a therapeutic effect by binding a specific antigen, thereby blocking ligand binding or altering the conformation of the antigen are included in this invention.

[0121] In some embodiments, a sustained-release or controlled-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, preferably one encoding a transgene of interest or a biological or therapeutic agent, 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.

[0122] 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 Therapeutics, San Carlos, CA).

[0123] 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 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.

[0124] 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

[0125] 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 CT, MR, or optical. 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. The optical imaging agent can be selected for example from the group including 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.

EXAMPLES

Example 1

5 [0126] This example illustrates a composition suitable for 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:

10 [0127] 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
15 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).

20

Therapeutic agent selection:

[0128] An 8 kilobase plasmid (pSport-based template, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) containing the entire transgene for blue fluorescent protein (BFP) and partial flanking
25 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
30 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:

[0129] 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. Nucleic acid-therapeutic dose was standardized across all groups as was total volume and final pH of the composition to be evaluated in cell culture.

[0130] 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:

[0131] 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:

5 [0132] 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
10 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 detectable levels)

Analysis of toxicity

15 [0133] 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
20 standardized to identical cell numbers by adjusting concentrations to matching OD₂₈₀ values prior to the OD₅₉₅ measurements

Data handling and statistical analysis:

25 [0134] 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
30 software (Abacus, Berkeley, CA).

Results:Efficiencies:

5 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) $15.035 \pm 1.098 \%$
- 10 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

[0135] 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;
- 25 2) 0.251 A;
- 3) 0.291 A;
- 4) 0.243 A;
- 5) 0.297 A;
- 6) 0.337 A.

30

Conclusions:

[0136] 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

[0137] This example illustrates the transport of a large nucleic acid across skin by a carrier of the invention after a single administration.

Backbone selection

[0138] 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

[0139] 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:

[0140] 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. Nucleic acid-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:

5 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

10 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

15 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 nucleic acid therapeutics:

25 [0141] 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
30 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

[0142] 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

[0143] 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:

[0144] 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.

10

Example 2: 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%)

15

[0145] 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).

20

Conclusions

[0146] 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

30

Example 3

5 [0147] This example illustrates the transdermal delivery of a large nucleic acid-based therapeutic across skin using a positively charged peptidyl carrier of the invention in seven sequential daily applications.

Backbone selection:

10 [0148] 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
15 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:

[0149] For the present experiment, an 8.5 kilobase plasmid (pSport-based template,
20 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.

25

Preparation of samples

[0150] 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
30 single dose experiments presented in the previous experiment. Nucleic acid-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 βgal plasmid (p/CMV-sport- βgal) per final
aliquot (i.e. 240 micrograms total) and peptidyl carrier KNR2 at a charge ratio of
35 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.

5 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

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

[0151] 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
15 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
20 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
25 treated caudal segment was snap frozen for solubilization studies.

Data handling and statistical analyses:

30 [0152] 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
35 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).

5 Results

[0153] 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.

10

Example 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.
AK	5.004	2.120
AL	0.250	0.060

15

P=0.0012 (Significant at 99%)

Example 4 (non-peptidyl carrier).

[0154] This example illustrates the transdermal delivery of a large nucleic acid-based therapeutic across skin, using a positively charged non-peptidyl carrier of the invention in seven sequential daily applications

Backbone selection.

[0155] 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.

30

Therapeutic agent selection.

[0156] 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.

[0157] In each case, an excess of polycation was employed to assemble a final complex that has an excess of positive charge. Nucleic acid-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 nucleic acid therapeutics

5 [0158] 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 portion of dorsal back skin (selected because the mouse cannot reach this region with mouth or limbs). Animals
10 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
15 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.

20 Data handling and statistical analyses

[0159] 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
25 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
30 repeated measures using Statview software (Abacus, Berkeley, CA).

Results:

[0160] 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
35 form - achieved statistically significant increases in delivery efficiency and transgene

expression versus PEI. The ultrapure form of PEIR exhibited trending toward higher efficiencies than standard PEIR consistent with the higher calculated specific activity of the reagent.

5 Example 4. 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%)

10 Conclusions:

[0161] 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
15 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.

20 Example 5

[0162] 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
25 single time administration relative to controls.

Backbone selection.

[0163] The positively charged backbone was assembled by covalently attaching – Gly₃Arg₇ to polylysine MW 112,000 via the carboxyl of the terminal glycine to free
30 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

[0164] Botox® brand of botulinum toxin A (Allergan) was selected for this experiment.

5 It has a molecular weight of approximately 150,000.

Preparation of samples

[0165] The botulinum toxin was reconstituted according to the manufacturer's instructions. An aliquot of the protein was biotinylated with a calculated 12-fold molar
10 excess of sulfo-NHS-LC biotin (Pierce Chemical). The labeled product was designated "Btox-b".

[0166] 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 nucleic acid complexes. A net neutral or positive charge prevents repulsion of the protein complex
15 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
20 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
25 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.

30 [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 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.

[0168] 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

[0169] 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:

[0170] 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.

Example 5. 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

5

P=0.0001 (Significant at 99%)

Example 6

10 [0171] 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
15 therapeutically delivered across intact skin as a topical agent using this peptidyl carrier (again, without covalent modification of the protein)

[0172] 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
20 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:

25 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.

30 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.

5 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.

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

[0173] 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
20 subjectively assessed.

Data handling and statistical analysis:

[0174] Digital abduction scores were tabulated independently by two blinded observers. Mean and standard error were subsequently determined for each group with analysis of
25 significance at 95% confidence in one way ANOVA repeated measures using Statview software (Abacus, Berkeley, CA).

Results:

[0175] Mean digital abduction scores after single-time topical administration of
30 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
5 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
10 KNR ("Essentia Btox lotion") could not be moved

Example 6 . 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")

15	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%)		

20 Conclusions:

[0176] 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
25 toxin does not function when applied topically in controls.

Example 7

[0177] This experiment demonstrates the performance of a non-peptidyl carrier in the
30 invention.

Backbone selection:

[0178] The positively charged backbone was assembled by covalently attaching -Gly₃Arg₇ to polyethyleneimine (PEI) MW 1,000,000 via the carboxyl of the terminal
35 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.

[0179] 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 nucleic acid 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:

[0180] 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

- 5 [0181] 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

- 10 [0182] 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
15 of botulinum toxin across skin relative to controls As before, animals were observed to
walk in circles toward the paralyzed limbs.

Example 7 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

20

Group	Mean	Std. Error
BA	0.833	0.307
AZ	3.917	0.083

P=0.0002 (Significant at 99%)

- Example 7. Repetition 2. Digital abduction scores 30 minutes after single-time topical
25 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:

[0183] 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.

[0184] 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

[0185] 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.

[0186] 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, ~2.5 x 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.

[0187] A column (1cm diameter x 14 cm height) of Sephadex G-25 (Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ) was slurred 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.

[0188] 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 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.

[0189] 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

[0190] To a solution of polylysine (10 mg 1.1 x 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 RT. The reaction was frozen at -78 °C overnight. The next day the reaction mixture was thawed to RT 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, for fractions 2-6 the opposite was true. Thus, successful covalent attachment of the TAT fragment to a peptidyl carrier, polylysine, was confirmed.

[0191] 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 Bto α -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

10 Group labeled "JL-2": 2.0 units of Bto α -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.

[0192] After noncovalent complex formation, particles were centrifuged at 12,000 $\times$ g in a rotary microcentrifuge for 5 minutes, then resuspended in 20 microliters of deionized water and evaporated on a Germanum attenuated total reflectance cell for IR. Presence of Bto α -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

[0193] 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.

[0194] The positively charged peptidyl 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". The control polycation was unmodified polylysine (designated "K2", Sigma Chemical Co., St Louis, MO) of the same size and from the same lot

[0195] 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 oligonucleic acid 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

[0196] 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

[0197] 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.

[0198] 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 which does not therapeutically alter blood glucose levels and a carrier which comprises a positively charged 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 wherein the composition provides greater transdermal delivery of the biologically active protein relative to the agent in the absence of the carrier.
3. A composition according to claim 2 in which the biologically active protein has therapeutic activity.
4. A composition comprising a non-protein non-nucleic acid biologically active agent and a carrier which comprises a positively charged 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
5. A composition according to claim 4 wherein the composition provides greater transdermal delivery of the biologically active agent relative to the agent in the absence of the carrier.
6. A composition according to claim 5 in which the biologically active agent has a therapeutic activity.
7. A composition according to claim 3 in which the therapeutic protein has a molecular weight of at least 50,000 kD.
8. A composition according to claim 1 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide.

9 A composition according to claim 8 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide having a molecular weight of from about 10,000 to about 1,500,000.

10. A composition according to claim 8 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide having a molecular weight of from about 25,000 to about 1,200,000.

11 A composition according to claim 8 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide having a molecular weight of from about 100,000 to about 1,000,000

12. A composition according to claim 8 in which the backbone comprises a positively charged polylysine

13 A composition according to claim 12 in which the backbone comprises a positively charged polylysine having a molecular weight of from about 10,000 to about 1,500,000

14 A composition according to claim 12 in which the backbone comprises a positively charged polylysine having a molecular weight of from about 25,000 to about 1,200,000.

15. A composition according to claim 12 in which the backbone comprises a positively charged polylysine having a molecular weight of from about 100,000 to about 1,000,000.

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

17. A composition according to claim 16 in which the nonpeptidyl polymer backbone comprises a positively charged polyalkyleneimine.

18. A composition according to claim 17 in which the polyalkyleneimine is a polyethyleneimine.

19 A composition according to claim 18 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 10,000 to about 2,500,000.

20 A composition according to claim 18 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 100,000 to about 1,800,000.

21 A composition according to claim 18 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 500,000 to about 1,400,000

22. A composition according to claim 1 in which the carrier comprises a positively charged polymer having attached positively charged branching groups independently selected from $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT and fragments thereof, and Antennapedia PTD and fragments or mixtures 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.

23 A composition according to claim 22 in which the positively charged branching groups are independently selected from groups having the formula - $(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$.

24 A composition according to claim 23 in which the subscript $n1$ is an integer of from about 1 to about 8.

25 A composition according to claim 23 in which the subscript $n1$ is an integer of from about 2 to about 5.

26. A composition according to claim 23 in which the subscript $n2$ is an odd number of from about 7 to about 17.

27. A composition according to claim 23 in which the subscript $n2$ is an odd number of from about 7 to about 13.

28. A composition according to claim 22 in which the branching groups are selected from HIV-TAT and fragments thereof

29. A composition according to claim 28 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

30. A composition according to claim 22 in which the branching groups are Antennapedia PTD groups or fragments thereof

31. A composition according to claim 22 in which the positively charged polymer comprises a polypeptide

32. A composition according to claim 31 in which the polypeptide is selected from polylysines, polyarginines, and polyornithines.

33. A composition according to claim 32 in which the polypeptide is a polylysine.

34. A composition according to claim 22 in which the polymer comprises a positively charged nonpeptidyl polymer

35. A composition according to claim 34 in which the nonpeptidyl polymer comprises a positively charged polyalkyleneimine.

36. A composition according to claim 35 in which the polyalkyleneimine is a polyethyleneimine.

37. A composition according to claim 4 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide.

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

39. A composition according to claim 37 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide having a molecular weight of from about 25,000 to about 1,200,000.

40. A composition according to claim 37 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide having a molecular weight of from about 100,000 to about 1,000,000.

41. A composition according to claim 37 in which the backbone comprises a positively charged polylysine

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

43. A composition according to claim 41 in which the backbone comprises a positively charged polylysine having a molecular weight of from about 25,000 to about 1,200,000

44. A composition according to claim 41 in which the backbone comprises a positively charged polylysine having a molecular weight of from about 100,000 to about 1,000,000.

45. A composition according to claim 4 in which the backbone comprises a positively charged nonpeptidyl polymer.

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

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

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

49. A composition according to claim 47 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 100,000 to about 1,800,000

50. A composition according to claim 47 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 500,000 to about 1,400,000.

51. A composition according to claim 4 in which the carrier comprises a positively charged polymer having attached positively charged branching groups independently selected from $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT and fragments thereof, and Antennapedia PTD and fragments or mixtures 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.

52. A composition according to claim 51 in which the positively charged branching groups are independently selected from groups having the formula - $(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$.

53. A composition according to claim 52 in which the subscript $n1$ is an integer of from about 1 to about 8.

54. A composition according to claim 52 in which the subscript $n1$ is an integer of from about 2 to about 5.

55. A composition according to claim 52 in which the subscript $n2$ is an odd number of from about 7 to about 17

56. A composition according to claim 52 in which the subscript $n2$ is an odd number of from about 7 to about 13.

57. A composition according to claim 51 in which the branching groups are selected from HIV-TAT and fragments thereof.

58. A composition according to claim 57 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

59. A composition according to claim 51 in which the branching groups are Antennapedia PTD groups or fragments thereof.

60. A composition according to claim 51 in which the positively charged polymer comprises a polypeptide.

61. A composition according to claim 60 in which the polypeptide is selected from polylysines, polyarginines, polyornithines, and polyhomoarginines

62. A composition according to claim 61 in which the polypeptide is a polylysine

63. A composition according to claim 51 in which the polymer comprises a positively charged nonpeptidyl polymer.

64. A composition according to claim 63 in which the nonpeptidyl polymer comprises a positively charged polyalkyleneimine.

65. A composition according to claim 64 in which the polyalkyleneimine is a polyethyleneimine.

66. A composition according to claim 4 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 positively charged carrier.

67. A controlled release composition according to claim 4
68. A composition according to claim 1 in which the biologically active protein is a botulinum toxin.
69. A composition according to claim 68 in which the botulinum toxin is selected from botulinum toxin serotypes A, B, C, D, E, F and G.
70. A composition according to claim 68 in which the botulinum toxin comprises a botulinum toxin derivative
71. A composition according to claim 68 in which the botulinum toxin comprises a recombinant botulinum toxin.
72. 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 positively charged backbone having attached positively charged branching groups and which is present in an effective amount for transdermal delivery
73. A kit according to claim 72 wherein the biologically active agent is a botulinum toxin.
74. A kit according to claim 72 in which the composition is contained in a device for administering the biologically active protein to a subject via the skin or epithelium.
75. A kit according to claim 74 in which the device is a skin patch.
76. 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 positively charged carrier having attached positively charged branching groups independently selected from $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT and fragments thereof, and Antennapedia PTD and fragments or mixtures 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.

77. A kit according to claim 76 in which the device is a skin patch.

78. A method of administering a biologically active protein which does not therapeutically alter blood glucose levels to a subject comprising topically applying to the skin or epithelium of the subject the protein in conjunction with an effective amount of a positively charged carrier comprising a positively charged backbone having attached positively charged branching groups, wherein the association between the carrier and the biologically active protein is non-covalent

79. A method according to claim 78 wherein the composition provides greater transdermal delivery of the biologically active protein relative to the agent in the absence of the carrier.

80. A method according to claim 79 in which the biologically active protein has therapeutic activity

81. A method of administering a non-protein non-nucleic acid 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 positively charged carrier comprising a positively charged backbone having attached positively charged branching groups, wherein the association between the carrier and the biologically active agent is non-covalent.

82. A method according to claim 81 wherein the composition provides greater transdermal delivery of the biologically active agent relative to the agent in the absence of the carrier.

83. A method according to claim 82 in which the biologically active agent has a therapeutic activity.

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

85. A method according to claim 80 in which the biologically active protein and carrier are administered separately to the subject.

86. A method according to claim 83 in which the biologically active protein and carrier are administered to the subject in a composition containing both components.

87. A method according to claim 83 in which the biologically active agent and carrier are administered separately to the subject.

88. A method according to claim 80 in which the composition is a controlled release composition or sustained release composition

89. A method according to claim 83 in which the composition is a controlled release composition or sustained release composition.

90. A method according to claim 80 in which the therapeutic protein is a botulinum toxin

91. A method according to claim 90 in which the botulinum toxin is selected from botulinum toxin serotypes A, B, C, D, E, F and G.

92. A method according to claim 90 in which the botulinum toxin comprises a botulinum toxin derivative.

93. A method according to claim 90 in which the botulinum toxin comprises a recombinant botulinum toxin.

94. A method according to claim 90 in which the botulinum toxin is administered to provide an aesthetic and/or cosmetic benefit to the subject.

95. A method according to claim 90 in which the botulinum toxin is administered to the subject for prevention or reduction of symptoms associated with muscle spasm or cramping.

96. A method according to claim 90 in which the botulinum toxin and the positively charged carrier are administered topically to a site on the face of the subject.

97. A method according to claim 90 in which the botulinum toxin and the positively charged carrier are administered topically to a site on the subject other than the face.

98. A composition comprising an antigen suitable for immunization and a carrier which comprises a positively charged 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.

99. A composition according to claim 98 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide.

100. A composition according to claim 99 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide having a molecular weight of from about 10,000 to about 1,500,000

101. A composition according to claim 99 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide having a molecular weight of from about 25,000 to about 1,200,000.

102. A composition according to claim 99 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide having a molecular weight of from about 100,000 to about 1,000,000.

103. A composition according to claim 99 in which the backbone comprises a positively charged polylysine.

104. A composition according to claim 103 in which the backbone comprises a positively charged polylysine having a molecular weight of from about 10,000 to about 1,500,000.

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

106. A composition according to claim 103 in which the backbone comprises a positively charged polylysine having a molecular weight of from about 100,000 to about 1,000,000.

107. A composition according to claim 98 in which the backbone comprises a positively charged nonpeptidyl polymer

108. A composition according to claim 107 in which the nonpeptidyl polymer backbone comprises a positively charged polyalkyleneimine

109. A composition according to claim 108 in which the polyalkyleneimine is a polyethyleneimine.

110. A composition according to claim 109 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 10,000 to about 2,500,000.

111. A composition according to claim 109 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 100,000 to about 1,800,000.

112. A composition according to claim 109 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 500,000 to about 1,400,000.

113. A composition according to claim 98 in which the carrier comprises a positively charged polymer having attached positively charged branching groups independently selected from $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT and fragments thereof, and Antennapedia PTD and fragments and mixtures 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

114. A composition according to claim 113 in which the positively charged branching groups are independently selected from groups having the formula $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$

115. A composition according to claim 114 in which the subscript $n1$ is an integer of from about 1 to about 8.

116. A composition according to claim 114 in which the subscript $n1$ is an integer of from about 2 to about 5.

117. A composition according to claim 114 in which the subscript $n2$ is an odd number of from about 7 to about 17.

118. A composition according to claim 114 in which the subscript $n2$ is an odd number of from about 7 to about 13

119. A composition according to claim 113 in which the branching groups are selected from HIV-TAT and fragments thereof.

120. A composition according to claim 119 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.

121. A composition according to claim 113 in which the branching groups are Antennapedia PTD groups.

122 A composition according to claim 113 in which the positively charged polymer comprises a polypeptide.

123. A composition according to claim 122 in which the polypeptide is selected from polylysines, polyarginines, and polyornithines

124 A composition according to claim 123 in which the polypeptide is a polylysine.

125 A composition according to claim 113 in which the polymer comprises a positively charged nonpeptidyl polymer.

126 A composition according to claim 125 in which the nonpeptidyl polymer comprises a positively charged polyalkyleneimine

127 A composition according to claim 126 in which the polyalkyleneimine is a polyethyleneimine.

128 A composition according to claim 98 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 positively charged carrier.

129 A controlled release composition according to claim 98.

130 A composition according to claim 98 in which the antigen is a botulinum toxin.

131. A composition according to claim 130 in which the botulinum toxin is selected from botulinum toxin serotypes A, B, C, D, E, F and G.

132. A composition according to claim 130 in which the botulinum toxin comprises a botulinum toxin derivative.

133. A composition according to claim 130 in which the botulinum toxin comprises a recombinant botulinum toxin

134. A composition according to claim 98 in which the antigen is suitable for childhood immunizations.

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 98

136. A kit according to claim 135 further comprising a custom applicator.

137. A kit according to claim 135 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 137 in which the device is a skin patch.

139. 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 positively charged carrier having attached positively charged branching groups independently selected from (gly)_{n1}-(arg)_{n2}, HIV-TAT and fragments thereof, and Antennapedia PTD and fragments and mixtures 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 antigen is non-covalent.

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

141. 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 positively charged carrier comprising a positively charged backbone having attached positively charged

branching groups, wherein the association between the carrier and the antigen is non-covalent..

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

143. A method according to claim 141 in which the antigen suitable for immunization and carrier are administered separately to the subject.

144 A method according to claim 141 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide

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

146 A method according to claim 144 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide having a molecular weight of from about 25,000 to about 1,200,000.

147 A method according to claim 144 in which the backbone comprises a positively charged polypeptide having a molecular weight of from about 100,000 to about 1,000,000.

148. A method according to claim 144 in which the backbone comprises a positively charged polylysine.

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

150. A method according to claim 148 in which the backbone comprises a positively charged polylysine having a molecular weight of from about 25,000 to about 1,200,000

151 A method according to claim 148 in which the backbone comprises a positively charged polylysine having a molecular weight of from about 100,000 to about 1,000,000.

152 A method according to claim 141 in which the backbone comprises a positively charged nonpeptidyl polymer.

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

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

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

156 A method according to claim 154 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 100,000 to about 1,800,000.

157 A method according to claim 154 in which the polyethyleneimine has a molecular weight of from about 500,000 to about 1,400,000.

158. A method according to claim 141 in which the carrier comprises a positively charged polymer having attached positively charged branching groups independently selected from $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT and fragments thereof, and Antennapedia PTD and fragments or mixtures 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.

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

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

161. A method according to claim 159 in which the subscript $n1$ is an integer of from about 2 to about 5.

162. A method according to claim 159 in which the subscript $n2$ is an odd number of from about 7 to about 17

163. A method according to claim 159 in which the subscript $n2$ is an odd number of from about 7 to about 13.

164. A method according to claim 158 in which the branching groups are selected from HIV-TAT and fragments thereof

165. A method according to claim 164 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.

166. A method according to claim 158 in which the branching groups are Antennapedia PTD groups.

167. A method according to claim 158 in which the positively charged polymer comprises a polypeptide.

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

169. A method according to claim 168 in which the polypeptide is a polylysine.
170. A method according to claim 158 in which the polymer comprises a positively charged nonpeptidyl polymer.
171. A method according to claim 170 in which the nonpeptidyl polymer comprises a positively charged polyalkyleneimine.
172. A method according to claim 171 in which the polyalkyleneimine is a polyethyleneimine
173. A method according to claim 141 in which the composition is a controlled release composition
174. A method according to claim 141 in which the antigen suitable for immunization is a botulinum toxin.
175. A method according to claim 174 in which the botulinum toxin is selected from botulinum toxin serotypes A, B, C, D, E, F and G.
176. A method according to claim 174 in which the botulinum toxin comprises a botulinum toxin derivative
177. A method according to claim 174 in which the botulinum toxin comprises a recombinant botulinum toxin.
178. A method according to claim 141 in which the antigen is suitable for childhood immunizations.
179. A method according to claim 141 in which the antigen suitable for immunization is administered to provide resistance to an environmental antigen.

180 A method according to claim 141 in which the antigen suitable for immunization is administered to provide resistance to a potential pathogen.

181. A method according to claim 141 in which the antigen suitable for immunization is administered to provide resistance to a potential biohazard.

182 A composition according to claim 4 in which a biologically active agent is an antifungal agent

183. A composition according to claim 182 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 positively charged carrier

184 A controlled release composition according to claim 182

185 A composition according to claim 182 in which the antifungal agent is selected from amphotericin B, fluconazole, flucytosine, itraconazole, ketoconazole, clotrimazole, econazole, griseofulvin, miconazole, nystatin, and ciclopirox

186 A kit for administration of an antifungal agent to a subject comprising a device for delivering the antifungal agent to the skin or epithelium of the subject and a composition according to claim 182.

187. A kit according to claim 186 further comprising a custom applicator.

188 A kit according to claim 186 in which the composition is contained in a device for administering an antifungal agent to a subject via the nail plate or adjacent anatomic structures.

189. A kit according to claim 186 in which the device is a prosthetic nail plate or lacquer.

190 A method according to claim 81 in which the biologically active agent is an antifungal agent.

191 A method according to claim 190 in which an antifungal agent and carrier are administered to the subject in a composition containing both components.

192. A method according to claim 190 in which the antifungal agent and carrier are administered separately to the subject.

193 A method according to claim 190 in which the composition is a controlled release composition.

194. A method according to claim 190 in which the antifungal agent is selective from amphotericin B, fluconazole, flucytosine, itraconazole, ketoconazole, clotrimazole, econazole, griseofulvin, miconazole, nystatin, and ciclopirox

195 A method according to claim 190 in which the antifungal agent is administered to treat the symptoms and signs of a fungal infection.

196 A method according to claim 190 in which the antifungal agent is administered to alter symptoms or signs of fungal infection of the nail plate or nail bed.

197 A positively charged polypeptide or nonpeptidyl polymer having attached positively charged branching groups independently selected from – (gly)_{n1}-(arg)_{n2}, HIV-TAT and fragments thereof, and Antennapedia PTD and fragments and mixtures 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.

198. A positively charged polypeptide or nonpeptidyl polymer according to claim 197 in which the positively charged branching groups are independently selected from groups having the formula –(gly)_{n1}-(arg)_{n2}.

199. A positively charged polypeptide or nonpeptidyl polymer according to claim 198 in which the subscript n1 is an integer of from about 1 to about 8.

200. A positively charged polypeptide or nonpeptidyl polymer according to claim 198 in which the subscript n1 is an integer of from about 2 to about 5.

201. A positively charged polypeptide or nonpeptidyl polymer according to claim 198 in which the subscript n2 is an odd number of from about 7 to about 17.

202. A positively charged polypeptide or nonpeptidyl polymer according to claim 198 in which the subscript n2 is an odd number of from about 7 to about 13.

203. A positively charged polypeptide or nonpeptidyl polymer according to claim 197 in which the branching groups are selected from HIV-TAT and fragments thereof.

204. A positively charged polypeptide or nonpeptidyl polymer according to claim 203 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

205. A positively charged polypeptide or nonpeptidyl polymer according to claim 197 in which the branching groups are Antennapedia PTD groups or fragments thereof.

206. A positively charged polymer according to claim 197 in which the positively charged carrier comprises a polypeptide.

207. A positively charged polymer according to claim 206 in which the polypeptide is selected from polylysines, polyarginines, polyornithines, and polyhomoarginines.

208. A positively charged polymer according to claim 207 in which the polypeptide is a polylysine

209. A positively charged polymer according to claim 197 in which the positively charged carrier comprises a positively charged nonpeptidyl polymer.

210. A positively charged polymer according to claim 209 in which the nonpeptidyl polymer comprises a positively charged polyalkyleneimine.

211. A positively charged polymer according to claim 210 in which the polyalkyleneimine is a polyethyleneimine.

212. A composition comprising a non-covalent complex of.

a) a positively-charged backbone; and

b) at least two members selected from the group consisting of.

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

ii) a negatively-charged backbone having a plurality of attached targeting agents, or alternatively a plurality of negatively-charged targeting moieties;

iii) at least one member selected from RNA, DNA, ribozymes, modified oligonucleotide and cDNA encoding a selected transgene;

iv) DNA encoding at least one persistence factor; and

v) a negatively-charged backbone having a plurality of attached biological agents, or alternatively a negatively-charged biological agent;

wherein the complex carries a net positive charge and at least one of the members is selected from i), ii), iii) or v).

213. A method for preparing a pharmaceutical or cosmeceutical composition, the method comprising combining a positively charged backbone component and at least two members selected from the group consisting of:

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

ii) a negatively-charged backbone having a plurality of attached targeting agents; or alternatively a plurality of negatively-charged targeting moieties;

iii) at least one member selected from RNA, DNA, ribozymes, modified oligonucleic acids and cDNA encoding a selected transgene;

iv) DNA encoding at least one persistence factor; and

v) a negatively-charged backbone having a plurality of attached biological agents or cosmeceutical agents, or a negatively-charged biological agent or cosmeceutical agent;

with a pharmaceutically or cosmeceutically acceptable carrier to form a non-covalent complex having a net positive charge, and at least one of the members is selected from i), ii), iii) or v).

214 A composition comprising insulin and an effective amount for transdermal delivery of the insulin, of a carrier comprising a positively charged backbone having attached positively charged branching groups, wherein the association between the carrier and insulin is non-covalent

215. A composition according to claim 214 containing insulin and a positively charged carrier in a weight ratio of from about 30:1 to about 1.01:1

216 A controlled release composition according to claim 214.

217. A kit for administration of insulin to a subject comprising insulin and a carrier which comprises a positively charged 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 insulin is non-covalent.

218. A kit according to claim 217 in which the composition is contained in a device for administering insulin to a subject via the skin or epithelium.

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

220. A method according to claim 219 in which the composition is a controlled release composition

221. A composition comprising an imaging moiety and a targeting agent and a carrier which comprises a positively charged 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 a biologically active protein is non-covalent.

222. A composition according to claim 221, wherein the imaging moiety and targeting agent are physically or chemically distinct.

223. A composition according to claim 221, wherein the imaging moiety and targeting agent are not both phosphate.

224. A composition according to claim 221 in which the imaging agent is an optical imaging agent.

225. A composition according to claim 224 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.

226. A composition according to claim 221 in which the imaging agent is suitable for magnetic resonance imaging.

227. A composition according to claim 221 in which the targeting agent recognizes melanoma.

228. A kit for administration of a composition according to claim 221 to a subject comprising a device for delivering the imaging and targeting moieties and a carrier which comprises a positively charged backbone having attached positively charged branching groups and which is present in an effective amount for transdermal delivery.

229. 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 positively charged carrier comprising a positively charged backbone having attached positively charged branching groups, wherein the association between the carrier and the biologically active protein is non-covalent

230 The method according to claim 229, wherein the imaging moiety and targeting agent are physically or chemically distinct.

231 The method according to claim 229, wherein the imaging moiety and targeting agent are not both phosphate

232. A method according to claim 229 in which the imaging agent is an -- optical imaging agent.

233. A method according to claim 232 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.

234. A method according to claim 229 in which the imaging agent is suitable for magnetic resonance imaging.

235. A method according to claim 229 in which the targeting agent recognizes melanoma.

236 A method according to claim 229 in which the composition is applied for screening of patients at risk for melanoma.

237. A method according to claim 229 in which the composition is applied to aid surgical excision of melanoma.

238. A method according to claim 229 in which the composition is applied in conjunction with photographic techniques or image analysis techniques

239 A composition comprising a non-covalent complex of:

a) a positively-charged backbone, and

b) at least two members selected from the group consisting of

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

ii) a negatively-charged backbone having a plurality of attached targeting agents; or a plurality of negatively-charged targeting moieties; and

iii) a negatively-charged backbone having a plurality of attached biological agents, or a negatively-charged biological agent,

wherein the complex carries a net positive charge and at least one of the members is selected from i), ii), iii) or v).

240 A method for preparing a pharmaceutical or cosmeceutical composition, the method comprising combining a positively charged backbone component and at least two members selected from the group consisting of:

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

ii) a negatively-charged backbone having a plurality of attached targeting agents, or alternatively a plurality of negatively-charged targeting moieties; and

iii) a negatively-charged backbone having a plurality of attached biological agents or cosmeceutical agents, or a negatively-charged biological agent or cosmeceutical agent;

with a pharmaceutically or cosmeceutically acceptable carrier to form a non-covalent complex having a net positive charge, with the proviso that at least one of the members is selected from i), ii), iii) or v).

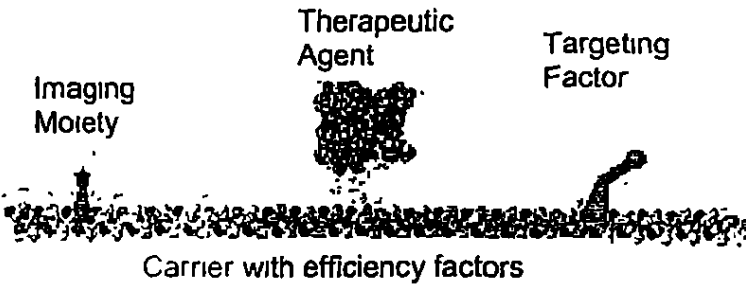


FIGURE 1

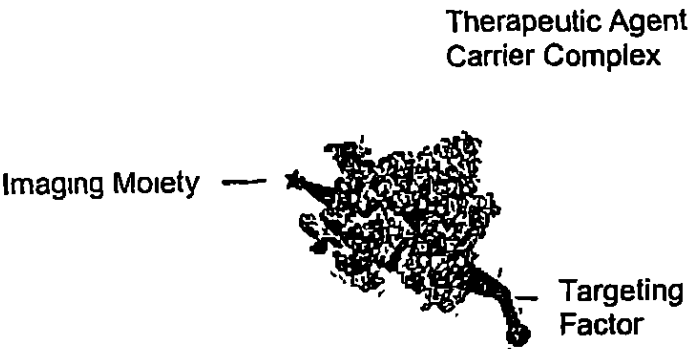


FIGURE 2

11

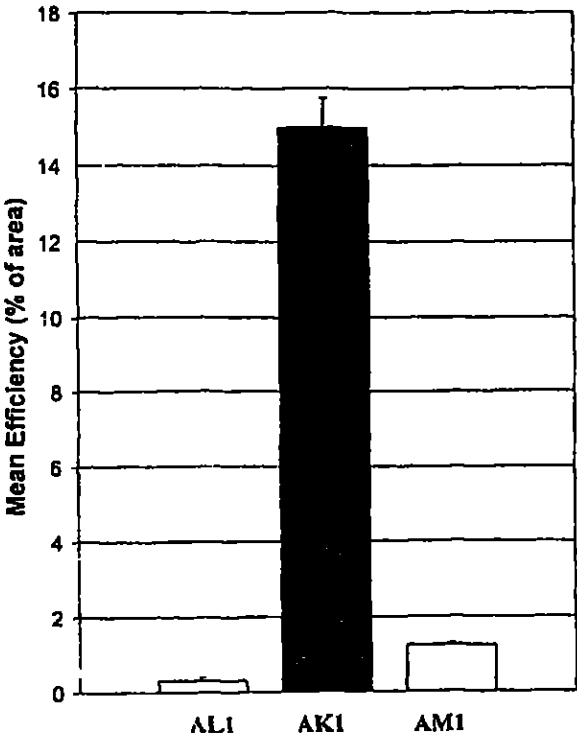


FIGURE 3 (% of cells showing positive)

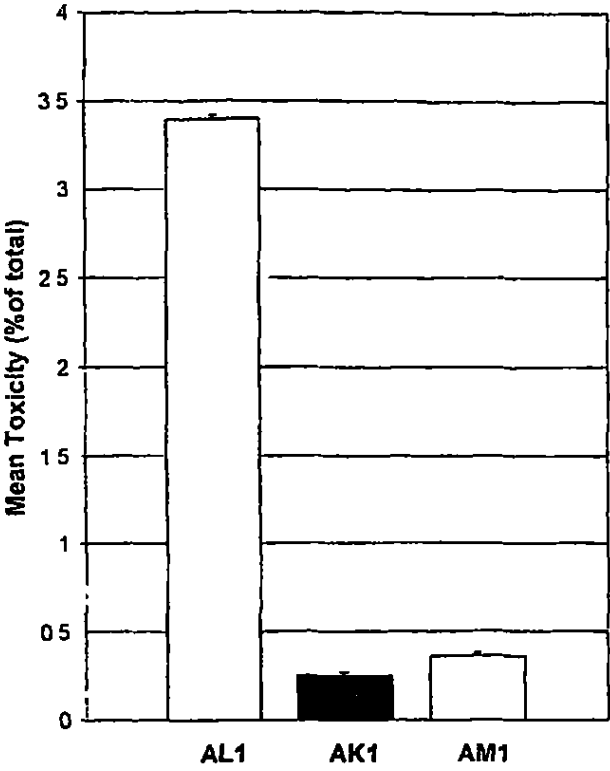


FIGURE 4 (mean nonviable cells, %)

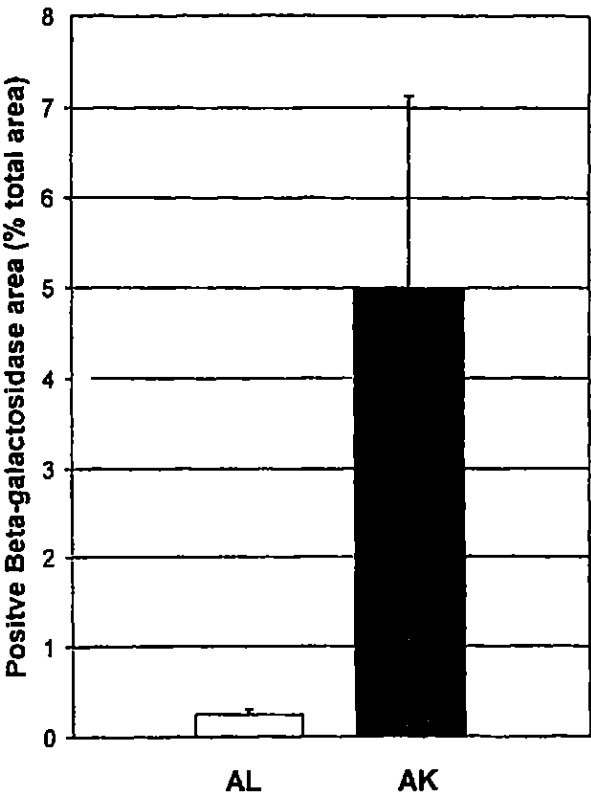


FIGURE 5 (7 days of once-daily administration)

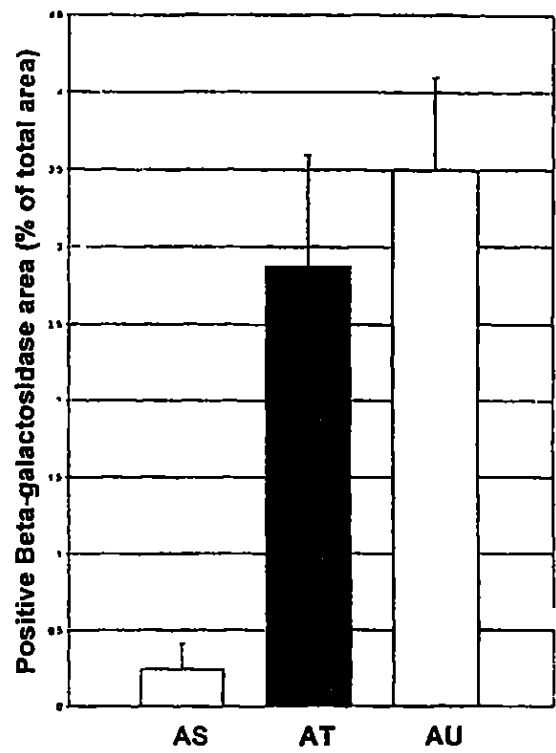


FIGURE 6 (transdermal delivery efficiency)

STI.

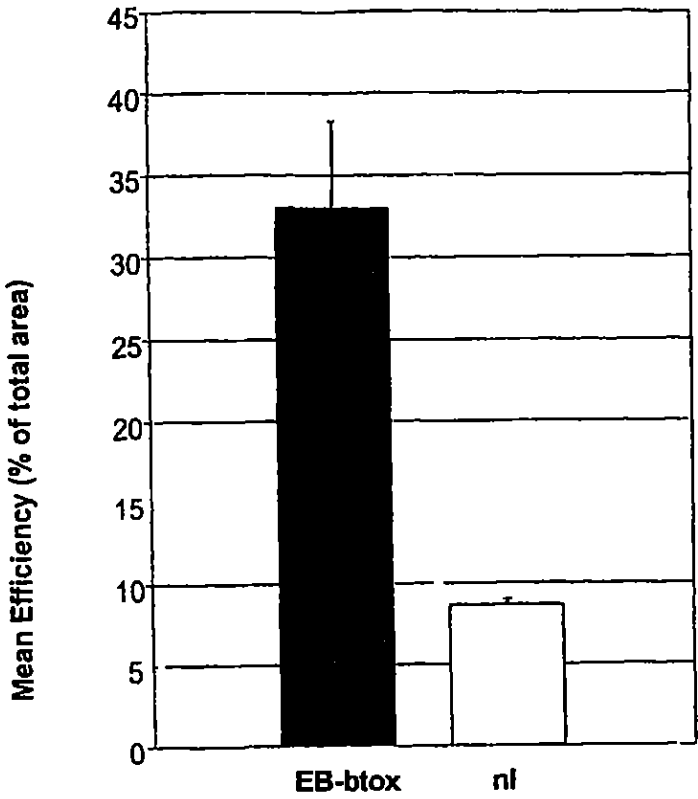


FIGURE 7 (efficiency of transdermal delivery)



SIIRSTITIITE SHEET (RIIIF 26)

117,

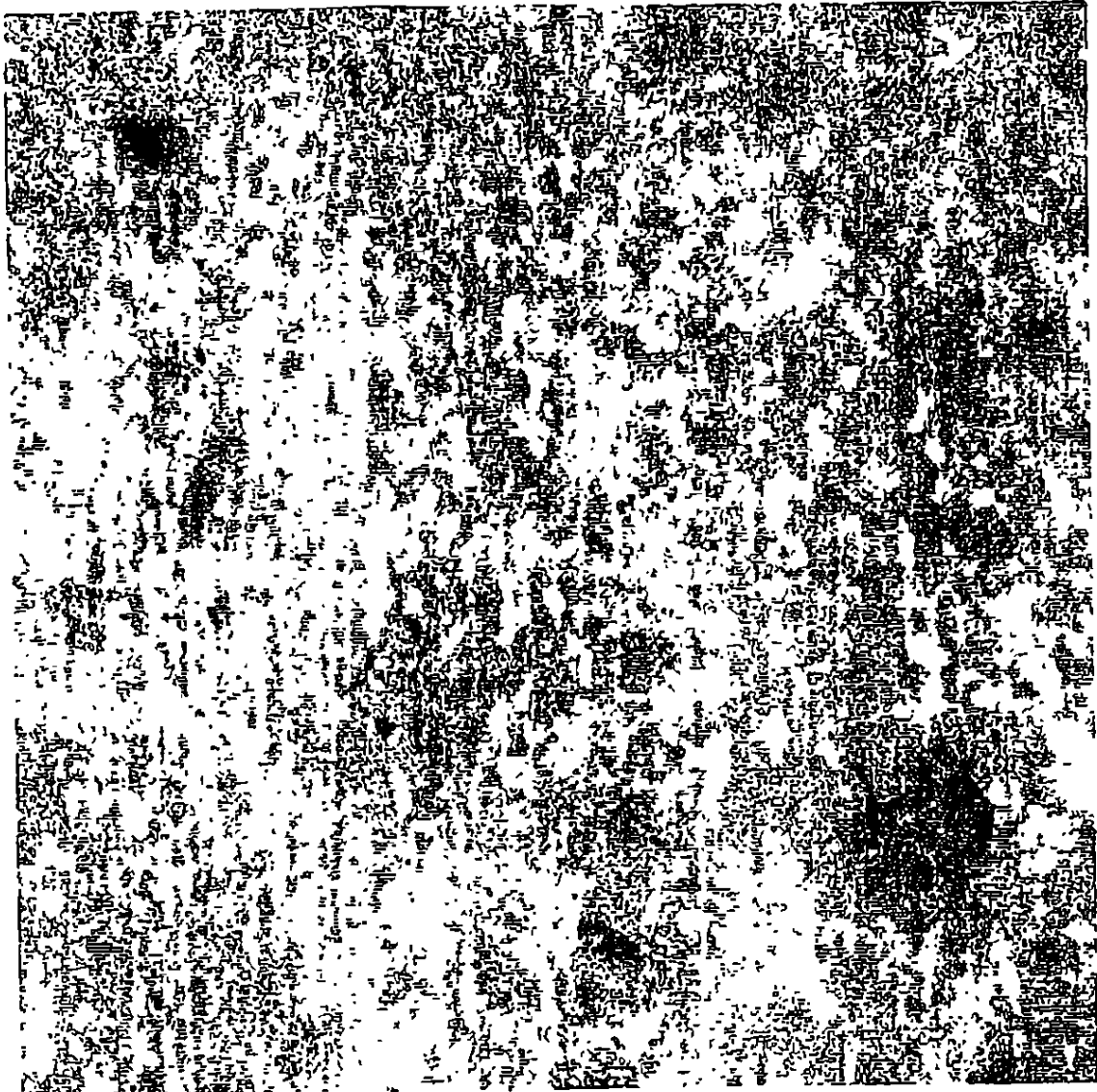


FIGURE 9A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

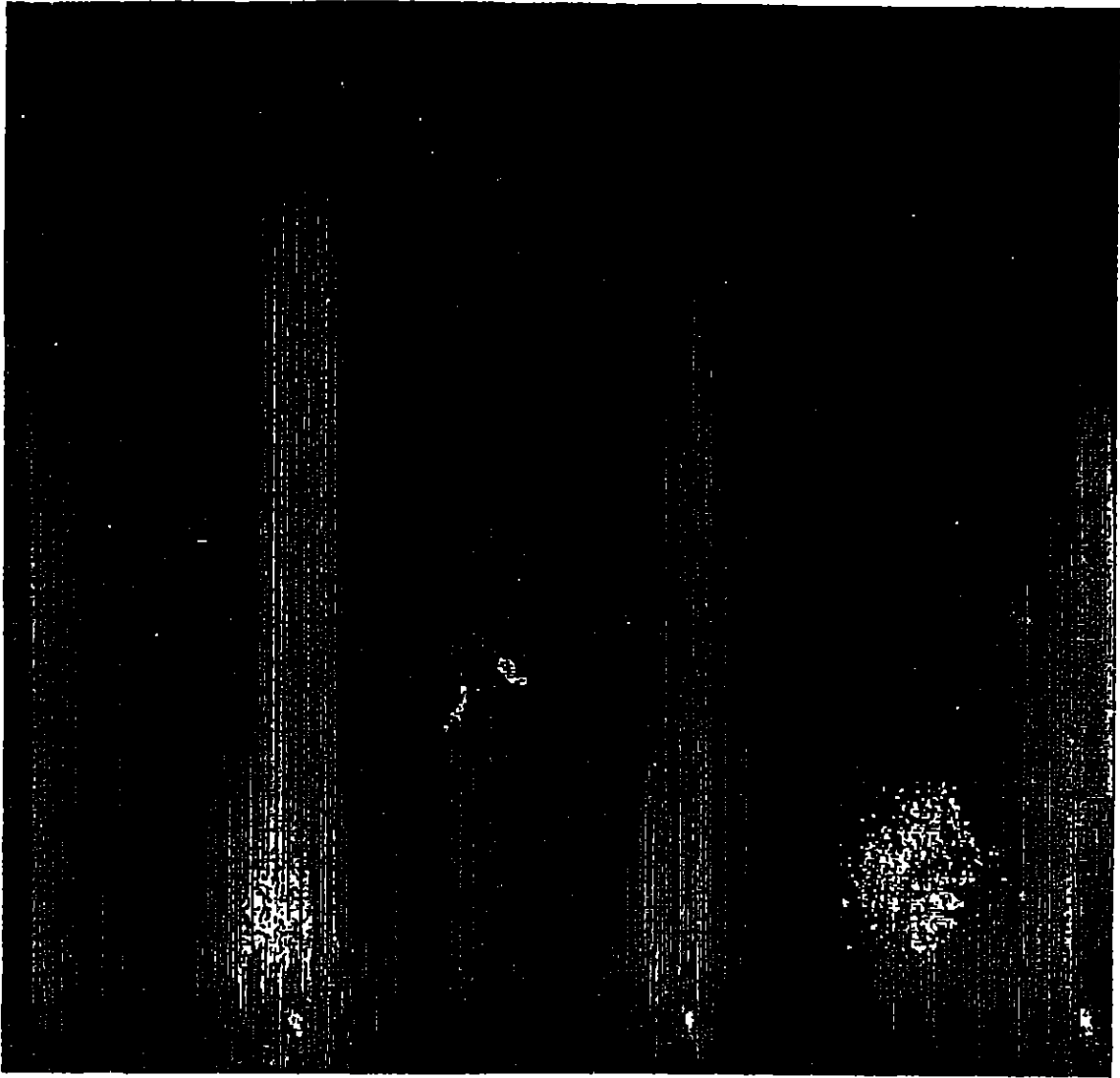


FIGURE 9B

119

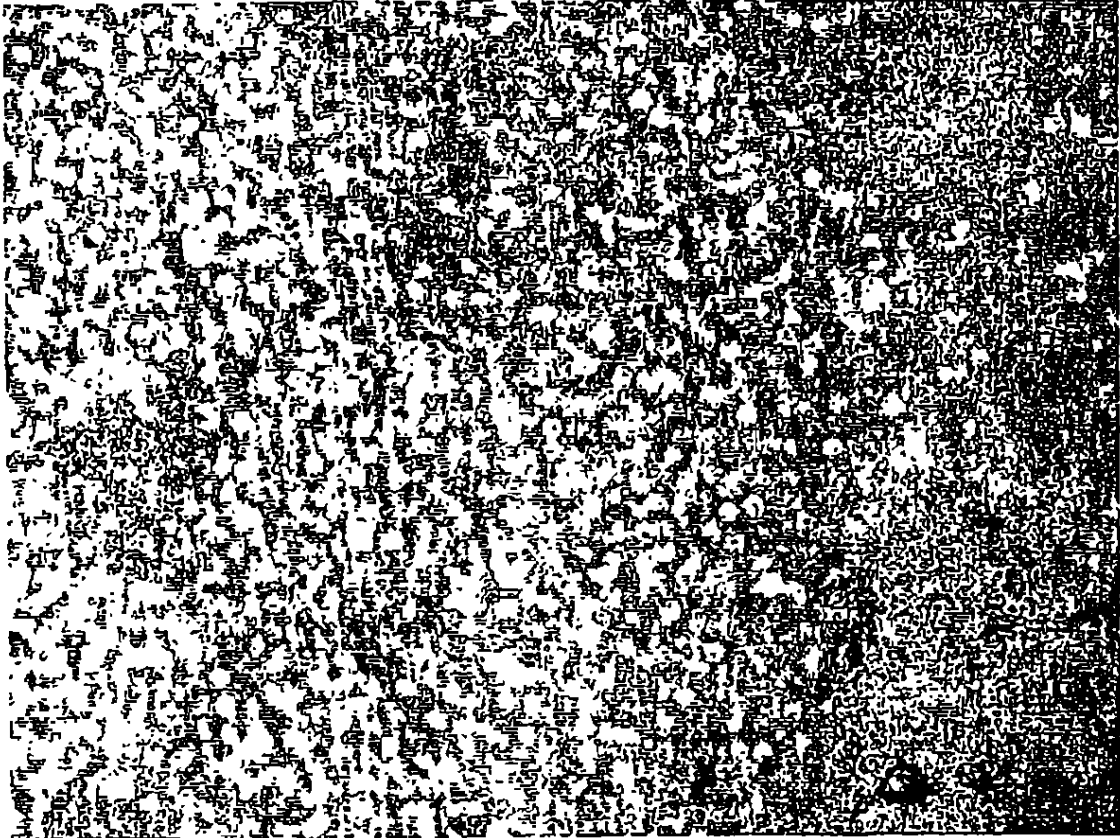


FIGURE 9C

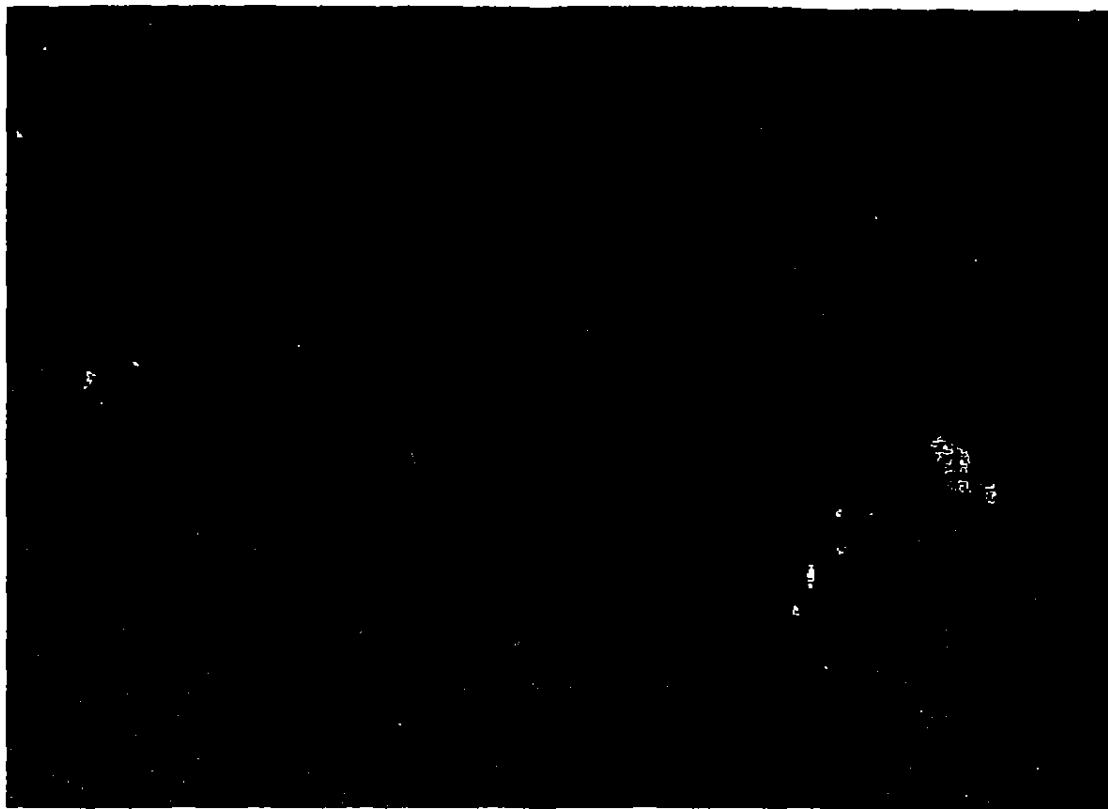


FIGURE 9D

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

SISTEMAS DE TRANSPORTE BIOLÓGICO MULTICOMPONENTE**REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

[0001] Esta solicitud es una continuación en parte de la solicitud U.S. No. 09/910,432 presentada en Julio 20, 2001, la cual a su vez reivindica prioridad de la solicitud provisional U.S. Ser. No. 60/220,44, presentada en Julio 21, 2000, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

**DECLARACIÓN DE LOS DERECHOS DE INVENCION HECHA BAJO
INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO FEDERALMENTE PATROCINADO**

[0002] No aplicable

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] Los sistemas de suministro de gen pueden ser ampliamente clasificados en dos grupos: viral y no viral. Los sistemas virales tienen riesgos de toxicidad mayor y han resultado de mayores complicaciones y muerte de ensayos clínicos. Los sistemas no virales son mucho menos eficientes que las aproximaciones virales pero ofrecen el potencial de adecuar las aplicaciones y mejorar la especificidad de la toxicidad y potencialmente disminuir la toxicidad. Las estrategias no virales pueden ser ampliamente clasificadas como basadas en lípido o no basadas en lípido. La estrategia presentada en esta invención se puede aplicar a cualquiera de las aproximaciones no virales existentes, de tal forma que todas se describirán aquí.

[0004] El sistema no viral más simple está dirigido al suministro de ADN. Debido a la carga negativa del ADN, muy poco del ADN de hecho entra a la célula y la mayoría se degrada. Virtualmente nada del ADN entra al núcleo sin una secuencia de blanco nuclear en la estrategia. Convencionalmente, se emplea otro factor para mejorar la eficiencia del suministro de gen/producto (ADN, ARN, o más recientemente terapéuticos de proteína) y mediante efectos mecánicos, tales como electroporación, ultrasonido, "pistola de gen" y microinyección dirigida, o neutralización de carga y efectos químicos con agentes tales como fosfato de calcio, polilisina, y preparaciones de liposoma. En las últimas estrategias, la neutralización de la carga se ha mostrado que incrementa las eficiencias no específicas varias veces sobre efectos químicos/mecánicos homogéneos de las preparaciones de liposomas solas. Con base en estos y resultados similares, muchos han concluido que el ADN y ARN requiere neutralización de carga para la eficiencia en la toma celular, en razón a que la carga negativa del ADN esencialmente precluye el transporte excepto por endocitosis con posterior fusión de lisosoma (escapado con adición de otros agentes). La mayoría de agentes de transfección actualmente utiliza un exceso de carga positiva en índices de 2-4 veces sobre la carga negativa de ADN. El híbrido resultante positivo se une iónicamente a las proteoglicanos de la superficie celular cargada negativamente y mejora dramáticamente la toma posterior. Algunos agentes de transfección vistos por tener un tropismo celular, más probablemente en razón los patrones estéricos y de carga que más efectivamente apuntan a proteoglicanos particulares, que varían en los patrones específicos de tipo de célula. Aún con los agentes apropiados, es decir (el tropismo correcto) la neutralización de carga sola o en combinación con liposomas permanece extremadamente ineficiente con relación a las estrategias virales. Así, la comunidad ha identificado un número de péptidos y fragmentos de péptidos que facilitan la eficiente entrada de un complejo en una

célula y pasan cualquier etapa de endolisosoma. Varios de todos los factores de transporte permiten aún un producto eficiente de interés de una pequeña, gen proteína, etc.). Esta aproximación requiere que una nueva droga unida al factor de transporte sea producida, purificada y ensayada. Muchos casos, estos híbridos constituirán de hecho nuevas droga y requerirán ensayo completo. Tales resultados de proceso son un riesgo adicional significativo y costoso. Alternativamente, un número de estrategias simplemente emplea la mezcla del agente no específicamente (o aún específicamente en la superficie) en las preparaciones de liposoma como vehículos para una droga/ADN/factor. Aunque una mejora sobre las modalidades directas o más simples en términos de eficiencias, estas aproximaciones permanecen ineficientes (con relación al virus) y considerablemente más tóxicas que las simples estrategias no virales. Parte de esta ineficiencia es debido a la pobre translocación nuclear. Como resultado, las estrategias han evolucionado para agregar señales de translocación nucleares al complejo detallado anteriormente, bien sea como parte del factor terapéutico híbrido o como parte de la mezcla de liposoma. Los refinamientos adicionales han incluido esfuerzos para reducir la ADN/ARN degradación de factor.

[0005] Quizás los refinamientos importantes en las estrategias básicas presentadas anteriormente han incluido ligandos específicos u otros agentes blanco junto con el factor terapéutico. Estas estrategias ofrecen el potencial de reducir grandemente la toxicidad no específica y las mejoras sustanciales en la eficiencia, particularmente, cuando se combina con los agentes de eficiencia descritos anteriormente. Sin embargo, las estrategias habituales confían en los enlaces covalentes para un vehículo simple y así necesitan una síntesis específica (para asegurar que las consideraciones estéricas en un grado de esquema de sustitución no favorezca un factor simple sobre los otros – es decir para asegurar

que cada factor de eficiencia y cada porción de imagen, y cada porción blanco esté presente en la estructura). Esto hace virtualmente imposible un número de construcciones específicas (por ejemplo, sialyl-lewis X y fragmento Fab a un antígeno de superficie, en razón a que las limitaciones estéricas imitarían la unión eficiente de uno u otro en la mayoría de los esquemas, y a su vez interferiría con los factores de eficiencia). Aunque promisoria en concepto, estas aproximaciones representan rendimientos costosos, muy bajos (en términos de síntesis), y soluciones no probadas a este problema.

[0006] Como debe ser evidente en cada etapa de desarrollo en el suministro de gel y factor no viral, se han encontrado problemas y, en la siguiente etapa resuelto con un grado de complejidad agregado. Cada mejora representa una etapa de incrementos sobre el estándar anterior. Sin embargo, la complejidad agregada lleva riesgo desde el punto de vista de cuidado del paciente y la ineficiencia y costo desde el punto de vista de producción. Estas barreras han conducido a un entusiasmo grandemente disminuido para estas otras terapias potenciales promisorias.

[0007] Lo que se requiere son nuevos métodos y composiciones que son totalmente aplicables a las composiciones de diversos agentes terapéuticos y cosmecéuticos que puedan ser blancos o imágenes para maximizar el suministro a un sitio particular. Sorprendentemente, la presente invención suministra tales composiciones y métodos.

[0008] Esta invención se relaciona además con formulaciones para el suministro transdérmico de proteínas tales como la insulina y también de terapéuticos mayores y sustancias de diagnóstico, por ejemplo, tales sustancias

que tienen peso molecular de 50, 000 y mayor incluyendo proteínas tales como toxina de botulinum, u otros agentes biológicamente activos tales como, por ejemplo, insulina, toxina de botulinum, una proteína terapéutica que no altera terapéuticamente los niveles de glucosa en la sangre, un agente basado en ácido nucleico, un agente terapéutico de ácido no nucleico sin proteína tal como ciertos antifúngicos o alternativamente un agente para inmunización. La invención destruye específicamente los fragmentos de anticuerpo que no tienen actividad biológica diferente de solamente unir el antígeno específico cuando el término "terapéutico" o "proteína biológicamente activa" se emplea. En razón a que los antígenos adecuados para la inmunización tienen otras actividades biológicas tales como montar una respuesta inmune, estos permanecen incluidos en los aspectos apropiados de esta invención, sin embargo. Más aun, los agentes que tienen una actividad biológica o un efecto terapéutico al unir un antígeno específico, bloquean de esta manera la unión de ligando o altera la conformación del antígeno están incluidos en esta invención.

[0009] Las toxinas de botulinum (también conocidas como toxinas de botulin o neurotoxinas de botulinum) son neurotoxinas producidas por la bacteria gram-positivo *Clostridium botulinum*. Ellas actúan para producir parálisis de los músculos y evitar la transmisión sináptica o liberación de acetilcolina a través de la unión neuromuscular, y se cree que actúan sobre otras vías también. Su acción esencialmente bloquea las señales que normalmente originarían los espasmos musculares o las contracciones, dando como resultado la parálisis, u originarían secreciones glandulares o sobre excreción tales como hiperhidrosis o acné.

[0010] La toxina de botulinum se clasifica en ocho neurotoxinas que están serológicamente relacionadas pero son distintas. De estas, siete pueden originar

parálisis, a saber los serotipos de neurotoxina de botulinum, A, B, C, D, E, F y G. Cada una de estas se distingue por neutralizaciones con anticuerpos de tipo específico. Cada tipo puede ser de ocurrencia natural recombinante en la producción o variantes trabajadas con ingeniería tales como fusiones de proteína. Sin embargo, el peso molecular de la molécula de proteína de toxina de botulinum, *para todas las siete de estos serotipos de toxina de botulinum activo de ocurrencia natural o sus formas recombinantes*, es de aproximadamente 150 kD. Tal como se libero por la bacteria, las toxinas de botulinum son complejas que comprenden la molécula de proteína de toxina de botulinum de 150 kD en cuestión junto con proteínas asociadas sin toxina. Los complejos tipo A de toxina de botulinum se pueden producir mediante bacterias de Clostridia como formas de 900 kD, 500 kD y 300 kD. Los tipos de toxina de botulinum B y C son aparentemente producido como solamente un complejo de 700 kD o 500 kD. La toxina de botulinum tipo D es producida en complejos de tanto 300 kD como de 500 kD. Las toxinas de botulinum tipo E y F son producidas como solamente complejos de aproximadamente 300 kD. Los complejos (es decir el peso molecular mayor de aproximadamente 150 kD) se cree que contiene una proteína de hemaglutinina sin toxina y una proteína no hemaglutinina sin toxina y no tóxica. Estas dos proteínas sin toxina (las cuales junto con la molécula de toxina de botulinum comprenden un complejo de neurotoxina relevante) pueden actuar para suministrar estabilidad contra la desnaturalización a la molécula de toxina de botulinum y la protección contra ácidos digestivos cuando se digiere la toxina. Adicionalmente, es posible que los complejos de toxinas de botulinum (mayores de aproximadamente 150 kD peso molecular) puedan resultar en una velocidad más lenta de difusión de la toxina de botulinum lejos del sitio de inyección intramuscular de un complejo de toxina de botulinum.

[0011] Los diferente serotipos de toxina de botulinum varían en las especies animales que ellos afectan en severidad y duración de la parálisis que ellos evocan. Por ejemplo, se ha determinado que la toxina de botulinum tipo A es 500 veces más potente, medida por la velocidad de parálisis producida en la rata, que la toxina de botulinum tipo B. Adicionalmente, la toxina de botulinum tipo B se ha determinado que no es toxica en primates a dosis de 480 U/kg, aproximadamente 12 veces el LD₅₀ del primate para el tipo A. Debido al tamaño molecular y a la estructura de la toxina de botulinum, esta no puede cruzar el estrato corneo y múltiples capas de la arquitectura de piel subyacente.

[0012] La toxina de botulinum tipo A se dice que es el agente biológico natural más letal conocido por el hombre. Las esporas de *C. botulinum* se encuentran en el suelo y pueden crecer en recipientes de alimento impropriadamente esterilizados y sellados. La ingestión de las bacterias puede originar botulismo, que puede ser fatal. Al mismo tiempo, los efectos de paralización de los músculos de la toxina de botulinum han sido utilizados para efectos terapéuticos. La administración controlada de botulinum se ha utilizado para suministrar a los músculos parálisis para tratar condiciones, por ejemplo, desordenes neuromusculares caracterizados por músculos de esqueletos hiperactivos. Condiciones que han sido tratadas con toxina de botulinum incluyen espasmo hemifacial, tortícolis espasmódica que ataca el adulto, fisura anal, blefaroespasma, parálisis cerebral, distonia cervical, dolores de cabeza de migraña, estrabismo, desorden de unión de empero mandibular, y varios tipos de calambres y espasmos musculares. Más recientemente, los efectos de parálisis muscular de la toxina de botulinum han tomado ventaja en aplicaciones faciales terapéuticas y cosmeceúticas tales como el tratamiento de arrugas, líneas de expresión, y otros resultados de espasmo o contracciones de los músculos faciales.

[0013] El botulismo, el síntoma característico complejo proveniente de la exposición a la toxina de botulinum sistémico, ha existido en Europa desde la antigüedad. En 1895, Emile p. van Ermengem aisló primero el vacilo que forma la espora anaeróbica proveniente de materia prima de carne de puerco salteada obtenida de tejido post-mortem de víctimas que habían muerto de botulismo en Bélgica. Van Ermengem encontró que la enfermedad era causada por una toxina extracelular que era producida por lo que el denominó *Bacillus botulinus* (Van Ermengem, Z HYYG Infektionaskr, 26:1-56; Rev Infect (1897)). El nombre se cambió en 1922 a *Clostridium botulinum*. El nombre de *Clostridium* fue utilizado para reflejar la naturaleza anaeróbica del microorganismo y también sus características morfológicas (Carruthers and Carruthers, Can J Ophtalmol, 31:389-400 (1996)). En los años veinte, una forma cruda de la toxina de botulinum tipo A se aisló después de acontecimientos adicionales en envenenamiento con alimentos. El Doctor Herman Sommer de la Universidad de California, San Francisco hizo el primer intento de purificar la neurotoxina (Borodic et al., Ophthalmic Plast Reconstr Surg, 7:54-60 (1991)). En 1946, el Doctor Edgard J Schantz y sus colegas aislaron la neurotoxina en forma cristalina (Schantz et al., In: Jankovi J, Halley M (Eds) Therapy with Botulinum Toxin, New Cork, NY: Marcel Dekker, 41-49 (1994)). En 1949, Burgen y sus asociados fueron capaces de demostrar que la toxina de Botulinum bloquea los impulsos a través de la unión neuromuscular (Burger et al., J Phsiol, 109:10-24 (1999)). Allan B. Scott utilizó primero la toxina A de botulinum (BTX-A) en monos en 1973. Scott demostró la parálisis muscular ocular reversible que dura 3 meses (Lamanna, Science, 130:763-772 (1959)). Poco después, el BTX-A se reportó por ser un tratamiento exitoso en humanos para estrabismo, blefaroespasma, y torticulis espasmódica (Baron et al., In: Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM (Eds), Bailey & Scotts

Diagnostic Microbiology, St. Louis, MO: Mosby Year Book, 504-523 (1994); Carruthers and Carruthers, Adv Dermatol, 12:325-348 (1997) Markowitz, In: Strickland GT (Eds) Hunters Tropical Medicine, 7th ed. Philadelphia: W B Saunders, 441-444 (1991)). En 1986, Jean y Alastair Carruthers, un equipo de esposo y esposa que consistían de un cirujano plástico y una dermatóloga iniciaron la evolución del uso cosmecéutico de la toxina A del botulinum (BTX-A) para el tratamiento de arrugas asociadas con el movimiento en el área de la glabella (Schantz y Scott, In Lewis GE (Ed) Biomedical Aspects of Botulinum, New York: Academia Press, 143-1359 (1981)). Los Carruther utilizaron el BTX-A para el tratamiento de las arrugas que condujeron a la publicación seminal de esta aproximación en 1992 (Schantz and Scott, In Lewis GE (Ed) Biomedical Aspects of Botulinum, New York: Academia PRes, 143-150 (1981)). En 1994, el mismo equipo reportó experiencias con otras arrugas asociadas a movimiento de la cara (Scott, Ophthalmol, 87:1044-1049 (1980)). Esto a su vez condujo al nacimiento de la era del tratamiento cosmecéutico del BTX-A.

[0014] La piel protege los órganos del cuerpo de las amenazas del ambiente externo y actúa como un termostato para mantener la temperatura del cuerpo. Este consiste de varias diferentes capas, cada una con funciones especializadas. Las capas principales incluyen la epidermis, la dermis y la hipodermis. La epidermis es una capa estratificada de células epiteliales que sobresale de la dermis, que consiste de un tejido cosmecéutico conectivo. Tanto la epidermis como la dermis son además sostenidas por la hipodermis, una capa interna del tejido adiposo.

[0015] La epidermis, la capa más exterior de la piel, es de solamente 0.1 a 1.5 milímetros de grueso (Inlander, Skin, New York, NY: People's Medical Society,

1-7 (1998)) Esta consiste de queratinocitos y está dividida en varias capas basada en su estado de diferenciación. La epidermis puede ser adicionalmente clasificada en el estrato corneo y la epidermis viable, que consiste de las células de mepighian y vasales granulares. El estrato corneo es higroscópico y requiere al menos 10% de humedad en peso para mantener su flexibilidad y suavidad. La higroscopicidad es atribuible en parte a la capacidad de mantener agua de la keratina. Cuando una capa cornea pierde su suavidad y flexibilidad ésta se vuelve áspera quebradiza, dando como resultado la piel seca.

[0016] La dermis, que descansa justo por debajo de la epidermis, es de 1.5 a 4 milímetros de gruesa. Esta es la más gruesa de las tres capas de la piel. Además, la dermis es también hogar de la mayoría de las estructuras de las estructuras de la piel que incluyen las glándulas sudoríparas y aceitosas (que secretan sustancia a través de las aberturas de la piel denominadas poros, o comedos) los folículos pilosos, las terminaciones nerviosas y los vasos sanguíneos y linfáticos (Inlander, Skin, New Cork, NY. People's Medical Society, 1-7 (1998)). Sin embargo, los principales componentes de la dermis son el colágeno y la elastina.

[0017] La hipodermis es la capa más profunda de la piel. Esta actúa tanto como un aislante para la conservación del calor del cuerpo como un absorbedor de choque para la protección del órgano (Inlander, Skin, New Cork, NY: People's Medical Society, 1-7 (1998)). Además, la hipodermis también almacena grasa para reservas de energía. El pH de la piel está normalmente entre 5 y 6. La acidez es debida a la presencia de aminoácidos anfotéricos, ácido láctico y ácidos grasos provenientes de las glándulas sebáceas. El termino "manto ácido" se refiere a la presencia de sustancias solubles en agua en la mayoría de las regiones de la piel.

La capacidad de amortiguamiento de la piel es debida en parte a estas secreciones almacenadas en la capa cornea de la piel.

[0018] Las arrugas, uno de los signos evidentes de la edad, se pueden originar por cambios bioquímicos, histológicos, y fisiológicos que se acumulan del daño ambiental (Benedetto, *Internacional Journal of Dermatology*, 38:641-655 (1999)). Además, existen otros factores secundarios que pueden originar los dobleces, surcos y pliegues de 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 empuje de la gravedad, la frecuente y constante presión posicional sobre la piel (es decir, durante el sueño), y los movimientos faciales repetidos originados por la 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)). Se han utilizado diferentes técnicas con el fin de modificar potencialmente algunos de los signos de envejecimiento. Estas técnicas varían desde las humectaciones faciales que tienen ácidos alfa hidroxí y retinol hasta procedimientos quirúrgicos e inyecciones de neurotoxinas.

[0019] Una de las funciones principales de la piel es suministrar una barrera para el transporte de agua y sustancias potencialmente dañinas para la homeostasis normal. El cuerpo se deshidrataría rápidamente sin una piel fuerte semipermeable. La piel ayuda a evitar la entrada de sustancias dañinas en el cuerpo. Aunque la mayoría de las sustancias no pueden penetrar la barrera, se ha desarrollado un número de estrategias para incrementar selectivamente la permeabilidad de la piel con éxito variable.

[0020] En razón a que el BTX no puede penetrar la piel eficientemente, con el fin de suministrar los efectos terapéuticos del BTX la toxina debe ser habitualmente inyectada en la piel. La Administración Federal para drogas y alimentos a aprobado tal procedimiento, para el tratamiento de arrugas, y los productos de BTX está ahora comercializados para el tratamiento. En tales tratamientos, la toxina de botulinum se administra mediante una inyección cuidadosamente controlada y monitoreada, quedando grandes pozos de toxina en el sitio del tratamiento. Sin embargo, tal tratamiento puede ser incomodo y más típicamente involucra algún dolor.

[0021] La aplicación tópica de la toxina de botulinum suministra un tratamiento alternativo más seguro y más deseable debido a la naturaleza indolora de la aplicación, el área de superficie de tratamiento mayor que puede ser cubierto, y la capacidad para formular una toxina pura con una actividad específica más alta, el entrenamiento reducido para aplicar la terapéutica de botulinum, las dosis más pequeñas necesarias para efectuar, y los pozos mayores de toxina no re requieren con el fin de alcanzar un resultado clínico terapéutico.

[0022] La administración transgénica de otros terapéuticos es también un área de gran interés debido, al potencial para la disminución de la incomodidad del paciente, la administración directa de agente terapéutico hacia el torrente sanguíneo, y las oportunidades para monitorear el suministro por vía del uso de dispositivos especialmente contruidos y/o formulaciones y técnicas de derivación controlada. Una sustancia para la cual la fase de administración es deseada es la insulina, la cual en muchos casos debe aún ser administrada mediante inyección (incluyendo autoinyección). La facilidad de la administración seria también ventajosa para proteínas mayores tales como la toxina del botulinum. Otros

agentes que no cruzan fácilmente la piel pero son sustancialmente más pequeños que la insulina o que tienen diferentes propiedades fisicoquímicas y así muy diferentes proporciones y capacidades para cruzar la piel con o sin materiales adicionales para facilitar esa transferencia. Las interacciones adicionales de cada uno con los materiales para facilitar la transferencia es única para cada uno.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0023] En un aspecto, la presente invención suministra una composición que comprende un complejo no covalente de:

a) una estructura cargada positivamente; y

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

i) una primer estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de porciones de imágenes unidas; o alternativamente una pluralidad de porciones de imágenes negativamente cargadas;

ii) una segunda estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes blanco unidos, o alternativamente una pluralidad de porciones blanco cargadas negativamente;

iii) al menos un miembro seleccionado de ARN, ADN, ribosomas, ácidos oligonucleicos modificados y cADN que codifica a un transgen seleccionado;

iv) ADN que codifica al menos un factor de persistencia;

v) una tercer estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes biológicos unidos, o un agente biológico cargado negativamente;

en donde el complejo lleva una carga neta positiva y al menos uno de los miembros se selecciona de i), ii), iii), o v).

[0024] El agente biológico, en este aspecto de la invención, puede ser un agente terapéutico o un agente cosmecéutico. La invención excluye específicamente los fragmentos de anticuerpo que no tengan actividad biológica diferente de solamente unir un antígeno específico cuando el término "terapéutico" o "proteína biológicamente activa" se emplea. En razón a que los antígenos adecuados para la inmunización tienen otras actividades biológicas tales como montar una respuesta inmune, estas permanecen incluidas en los aspectos apropiados de ésta invención. Más aún, los agentes que tienen una actividad biológica o un efecto terapéutico al unir un antígeno específico, bloquean de esta manera el ligando que une o altera la conformación del antígeno que están incluidas en esta invención. Alternativamente, los agentes candidato pueden ser utilizados para determinar la eficacia en vivo de estos complejos no covalentes.

[0025] 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 al menos un miembro de ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste de ARN, ADN, ribosomas, ácidos oligonucleicos modificados y cADN que codifica a un transgen seleccionado

[0026] En otro aspecto, la presente invención suministra un método para suministrar un agente biológico a una superficie celular en un sujeto, dicho método comprende administrar a dicho sujeto una composición como se describió anteriormente.

[0027] En aún otro aspecto, la presente invención suministra un método para preparar una composición farmacéutica o cosmeceútica, el método comprende combinar un componente de estructura cargado positivamente y al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste de:

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

ii) una segunda estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes de blanco unidos, o alternativamente una pluralidad de porciones de blanco cargadas negativamente,

iii) y al menos un miembro seleccionado de ARN, ADN, ribosomas, ácidos oligonucleicos modificados y cADN que codifica el transgen seleccionado;

iv) ADN que codifica al menos un factor de persistencia; y

v) una tercer estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes biológicos unidos o agentes cosmeceúticos, o un agente biológico cargado negativamente o un agente cosmeceútico; con un portador farmacéutica o cosmeceúticamente aceptable para formar un complejo no covalente que tiene una carga positiva neta, con la condición de que al menos uno de dichos miembros se selecciona de i), ii), iii), o v).

[0028] En aún otro aspecto, la presente invención suministra un kit para formular una composición de suministro farmacéutica o cosmeceútica, el kit comprende una estructura componente y tiene dos componentes seleccionados de los grupos i) hasta v) anterior, junto con instrucciones para preparar las composiciones de suministro

[0029] En aún otro aspecto, esta invención se relaciona con una composición que comprende un agente biológicamente activo, tal como insulina, toxina de botulinum, otras proteínas que no alteran terapéuticamente los niveles de glucosa de la sangre, un agente basado en ácido nucleico, un agente terapéutico de ácido, sin proteína de ácido no nucleico tal como ciertos antifúngicos alternativamente un agente para inmunización, y un vehículo que comprende un vehículo cargado positivamente que tiene una estructura con la ramificación cargada positivamente unida o grupos de "eficiencia" todos como se describen aquí. La invención excluye específicamente los fragmentos de anticuerpo que no tienen actividad biológica diferente a solamente unir un antígeno específico cuando el término "terapéutico" o "proteína biológicamente activa" se emplea. En razón a que los antígenos adecuados para la inmunización tienen otras actividades biológicas tales como montar una respuesta inmune, estos permanecen incluidos en los aspectos apropiados de ésta invención, sin embargo. Más aún, los agentes que tienen una actividad biológica o un efecto terapéutico al unir un antígeno específico, bloquean de esta manera la unión de ligando o alteran la conformación del antígeno están incluidos en esta invención. El agente biológicamente activo es preferiblemente insulina, toxina de botulinum (BTX) un antígeno para inmunización, o ciertos agentes antifúngicos. Los agentes antifúngicos adecuados incluyen, por ejemplo, amfotericina B, fluconazol, flucitosina, itraconazol, cetoconazol, clotrimazol, econozol, griseofulvina, miconazol, nistatina, ciclopirox, y similares. Más preferiblemente es un vehículo polipéptido comparativamente cargado positivamente de cadena corta o media o un polímero no peptídico positivamente cargado, por ejemplo, una polialquilenimina. Cuando el agente biológicamente activo es toxina de botulinum, la invención se relaciona además con un método para producir un efecto biológico tal como la parálisis del músculo, reduce la hiperscreción o

sudoración, tratando el dolor neurológico o el dolor de cabeza de migraña, reduciendo los espasmos musculares, reduciendo el acné, o reduciendo mejorando una respuesta inmune, al aplicar tópicamente una composición que contiene una cantidad efectiva de toxina de botulinum, preferiblemente, a la piel, de un sujeto o paciente necesitado de tal tratamiento. La invención también se relaciona con un método para producir un efecto estético y/o cosmeceútico, por ejemplo mediante la aplicación tópica de toxina de botulinum a la cara en lugar de mediante la inyección o los músculos faciales. Cuando el agente biológicamente activo es insulina, la invención se relaciona con un método de suministrar transdérmicamente insulina a un sujeto al aplicar a la piel o epitelio del sujeto una cantidad efectiva de tal composición que contiene insulina, o una combinación de insulina, y una estructura cargada positivamente. Las proteínas que no son normalmente capaces de cruzar la piel o epitelio apreciablemente con relación al complejo del mismo agente y a los vehículos de la presente invención y que no tienen efecto terapéutico sobre la disminución de la glucosa en la sangre tienen una superficie ampliamente diferente y unas propiedades físico químicas de la insulina que normalmente la harían incierta si una técnica que logra el suministro transdérmico de insulina tuviera resultados positivos para cualquier otra proteína. Sin embargo, los vehículos de ésta invención que tienen una estructura positivamente cargada con grupos de ramificación positivamente cargados, como se describió aquí son muy sorprendentemente capaces de suministrar suministro transdérmico de tales otras proteínas, incluyendo, por ejemplo toxina de botulinum. Los vehículos particulares adecuados para el suministro transdérmico de proteínas particulares pueden ser fácilmente identificados utilizando ensayos tales como aquellos descritos en los ejemplos. Tales proteínas pueden, por ejemplo ser una proteína grande que tiene un peso molecular sobre 50.000 kD o por debajo de 20.000 kD. Como se utiliza aquí, la palabra "terapéutico" en el contexto de la

glucosa de sangre se refieren a declinar los niveles de glucosa de la sangre lo suficiente para aliviar los síntomas agudos o los signos de la hiperglicemia, por ejemplo en pacientes diabéticos. En todos los aspectos de la presente invención, la asociación entre el vehículo y el agente biológicamente activo es mediante interacción no covalente, la cual puede incluir, por ejemplo, infracciones iónicas, unión de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, o combinaciones de éstas. En ciertos aspectos de la invención, el suministro transdérmico de las proteínas terapéuticas capaces de lograr las alteraciones terapéuticas de la glucosa de la sangren están específicamente excluidos. Como se emplea aquí, los agentes antigénicos adecuados para la inmunización pueden ser antígenos basados en proteína que no alteran terapéuticamente los niveles de glucosa de la sangre, agentes no proteína de no ácido nucleico o híbridos de éstos. Los ácidos nucleicos que codifican a los antígenos son específicamente no adecuados para las composiciones de la presente invención, sin embargo. Así, los agentes incluidos son en si mismo antígenos adecuados para la inmunización. Los antígenos adecuados incluyen, por ejemplo, aquellos para los agentes ambientales, patógenos o biorriesgos. Los agentes adecuados preferiblemente incluyen, por ejemplo, antígenos relacionados con botulismo, malaria, rabias, ántrax, tuberculosis, o relacionados con las inmunizaciones en los niños, tales como la hepatitis B, la difteria, pertusis, tétano, hemofilus influenza tipo b, poliovirus inactivado, viruela, parotitis, rubéola, varicela, neumococo, hepatitis A, e influenza.

[0030] Los vehículos o estructuras cargados positivamente con sus grupos ramificados cargados positivamente, como se describen aquí, son ellos mismos compuestos novedosos, y forman Otro aspecto de la invención.

[0031] Esta invención también suministra un método para preparar una composición farmacéutica o cosmeceútica que comprende combinar un vehículo que comprende, un polipéptido cargado positivamente o un polímero no peptídico cargado positivamente tal como una polialquilenimina de cadena larga, el polipéptido o el polímero no peptídico que tiene la ramificación positivamente cargada o grupos "eficiencia" como se definen aquí, con un agente biológicamente activo, tal como, por ejemplo, insulina, toxina de botulinum, una proteína terapéutica que no altera terapéuticamente los niveles de glucosa de la sangre, un agente basado en ácido nucleico, un agente terapéutico de no proteína no ácido nucleico tal como ciertos antifúngicos o alternativamente urgente para inmunización. La invención también suministra un kit para preparar o formular tal composición que comprende un vehículo y una sustancia terapéutica, así como también tales ítems adicionales que son necesarios para producir una formulación utilizable, una pre-mezcla que pueda a su vez ser utilizada para producir tal formulación. Tal kit puede consistir de un aplicador u otro dispositivo para las aplicaciones o las composiciones o los componentes de éstos y los métodos de la presente invención. Como se utiliza aquí "dispositivo" se puede referir por ejemplo a un instrumento o aplicador para suministrar o mezclar u otra técnica de preparación para formar o aplicar las composiciones y los métodos de la presente invención.

[0032] Esta invención también comprende dispositivos para la transmisión transdérmica de un agente biológicamente activo tal como, por ejemplo, insulina, toxina de botulinum, una proteína terapéutica que no altera terapéuticamente los niveles de glucosa de la sangre, un agente basado en ácido nucleico, un agente terapéutico sin proteína sin ácido nucleico, tal como ciertos antifúngicos o alternativamente un agente para la inmunización que está contenido dentro de la

composición que, a su vez, en una modalidad, comprende un vehículo que comprende un polipéptido cargado positivamente de preferiblemente cadena corta para intermediar la longitud de cadena o un vehículo polimérico no peptídico de cadena más blanca que tiene una ramificación cargada positivamente o grupos "eficiencia" como se definen aquí, y un agente terapéutico como ya se mencionó. Tales dispositivos pueden ser tan simples en construcción como un parche de piel, o puede ser un dispositivo más complicado que incluya medios para dispersar y monitorear el suministro de la composición, y opcionalmente medios para monitorear la condición del sujeto en uno o más aspectos, incluyendo monitorear la reacción del sujeto a las sustancias que están siendo suministradas. En todos los aspectos de la presente invención, el asocio entre el vehículo y el agente biológicamente activo es mediante interacción no covalente, lo cual puede incluir, por ejemplo, interacciones iónicas, uniones de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, o combinaciones de éstos.

[0033] Alternativamente el dispositivo puede contener solamente el agente biológicamente activo terapéutico por ejemplo, insulina, toxina de botulinum, una proteína terapéutica que no altera terapéuticamente los niveles de glucosa de la sangre, un agente basado en ácido nucleico, un agente terapéutico sin proteína sin ácido nucleico, tal como ciertos antifúngicos o alternativamente un agente para inmunización, y el vehículo se puede aplicar separadamente a la piel. De acuerdo con esto, la invención también comprende un kit que incluye tanto un dispositivo para ser suministrado por vía de la piel y un material que contiene el vehículo o estructura positivamente cargado, y que es adecuado para aplicar a la piel o epitelio de un sujeto.

[0034] En general, la invención también comprende un método para administrar un agente biológicamente activo tal como, por ejemplo, insulina, toxina de botulinum, una proteína terapéutica que no altera terapéuticamente los niveles de glucosa de La sangre, un agente basado en ácido nucleico, un agente terapéutico sin proteína sin ácido nucleico tal como ciertos antifúngico s o *alternativamente un agente para inmunización a un sujeto o paciente necesitado de ello*, que comprende administrar tópicamente una cantidad efectiva de dicho agente biológicamente activo en conjunto con un polímero polipeptido cargado positivamente o polímero no polipeptidilo tal como una polialquilenoimina que tiene grupos ramificados cargados positivamente, como se describió aquí. Por "en conjunto con" significa que dos componentes – agentes biológicamente activo y vehículo positivamente cargado – son administrados en un procedimiento de combinación, que pueden involucrar combinarlos en una composición, la cual es luego administrada al sujeto, o administrarlo separadamente, pero de manera tal que ellos actúan juntos para suministrar el suministro requisito de una cantidad efectiva de agente biológicamente activo. Por ejemplo, una composición que contiene el vehículo positivamente cargado puede primero ser aplicada a la piel del sujeto, seguido mediante la aplicación de un parche de piel u otro dispositivo que contiene el agente biológicamente activo.

[0035] La invención también se relaciona con métodos para aplicar los agentes biológicamente activos tales como, por ejemplo, insulina, toxina de botulinum, una proteína terapéutica que no altera terapéuticamente los niveles de glucosa en la sangre, un agente basado en ácido nucleico, un agente terapéutico son proteína sin ácido nucleico tal como ciertos antifúngico s *alternativamente un agente para la inmunización como se definió aquí a las células epiteliales*, que

incluye aquellas diferentes a las células de piel epiteliales por ejemplo, las células oftálmicas del epitelio o las células del sistema gastrointestinal.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0036] La figura 1 suministra una representación esquemática de los componentes utilizados en la invención.

[0037] La figura 2 suministra una representación esquemática de varias modalidades de la invención.

[0038] Las figuras 3-4 representan los resultados del suministro transdérmico de un plásmido que contiene el transgen para la E. coli beta – galactosidasa como se describió en el ejemplo 2.

[0039] La figura 5 representa los resultados del suministro transdérmico de un plásmido que contiene el transgen para E. coli beta – galactosidasa como se describió en el ejemplo 3.

[0040] La figura 6 representa los resultados del suministro transdérmico de un plásmido que contiene el transgen para E. coli beta – galactosidasa como se describió en el ejemplo 4.

[0041] La figura 7 representa los resultados del suministro transdérmico de una toxina de botulinum como se describió en el ejemplo 5.

[0042] La figura 8 es una descripción fotográfica de los resultados de un suministro transdérmico de una toxina de botulinum como se describió en el ejemplo 6

[0043] La figura 9 es una descripción fotográfica de los complejos de imágenes del ejemplo 9 que sigue la distribución de campo brillante (paneles a y c) para las células pigmentadas de melanoma con agentes de imágenes ópticos fluorescentes (paneles b y d) para dos diferentes campos y diferentes ampliificaciones (paneles a y b en 10X versus paneles c y d con ampliificación 40 X)

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

General

[0044] La presente invención suministra un sistema basado en componente para el suministro selectivo, persistente de agentes de imagen, genes u otros agentes terapéuticos. Las características individuales para las composiciones se pueden seleccionar mediante componentes deseados designados en formulaciones al lado del lecho. Adicionalmente, en un aspecto, las imágenes y las porciones con blanco específico se suministran sobre estructuras negativamente cargadas paradas que formarán un complejo iónico no covalente con una estructura positiva. Al ubicar estos componentes sobre una estructura cargada negativamente, la invención obvia necesidad de unir los componentes en sitios precisos sobre una estructura positiva como se emplea en otras estrategias (incrementando la complejidad y el costo y disminuyendo la eficiencia a un nivel

en la cual no se ha reportado una combinación exitosa debido a las limitaciones estéricas).

[0045] En otro aspecto, ciertas sustancias pueden ser suministradas térmicamente mediante el uso de ciertos vehículos positivamente cargados solos, sin requerir la inclusión de una estructura negativa. En estos casos, la sustancia de un derivado de ésta tiene suficiente carga negativa para asociarse con los vehículos positivamente cargados 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 la partícula o la espectrometría funcional versus los componentes solos.

[0046] El entendimiento adicional de la invención se suministra con referencia a la Figura 1. En esta figura, los componentes son mostrados como (1) una estructura sólida que tiene grupos cargados unidos positivamente (también denominados como grupos eficiencia mostrados como círculos oscurecidos unidos a una barra oscurecida.), por ejemplo $(\text{Gly})_{n1}-(\text{Arg})_{n2}$ (en donde el valor $n1$ es un entero de 3 a aproximadamente 5, y el valor $n2$ es un entero impar de aproximadamente 7 a aproximadamente 17) o los dominios TAT, (2) una estructura cargada negativamente corta que tiene porciones de imágenes unidas (triángulos abiertos unidos a una barra ligera), (3) una estructura negativamente corta que tiene agentes blanco unidos y/o agentes terapéuticos (círculos abiertos unidos o una barra clara); (4) un ácido oligonucleico, ARN, ADN o cADN (barra clara achurada cruzada); y (5) ADN que codifica los factores de persistencia (barra oscura achurada cruzada). La figura 2 ilustra varios ejemplos de composiciones multicomponente en donde los grupos son descritos como se establece en la figura 1. Por ejemplo, la Figura 1 una primer composición multicomponente se

ilustra en la cual una estructura positivamente alargada se ha asociado con un componente de imagen, un componente blanco, un ácido oligonucleico y un factor de persistencia.

[0047] Una segunda composición multi componente se ilustra la cual se designa para imagen de diagnostico/pronostico. En esta composición la estructura positivamente cargada es puesta en complejo con tanto los componentes de imagen como los componentes de blanco. Finalmente, un tercer sistema multi componente se ilustra la cual es útil para el suministro De gen. En este sistema, se gorma un complejo entre la estructura positivamente cargada, un componente de blanco, m un gen de interés de ADN que codifica el factor de persistencia. La presente invención, descrita más completamente adelante, suministra un número de composiciones adicionales útiles en los programas terapéuticos y de diagnostico.

DESCRIPCIÓN DE LAS MODALIDADES

Composiciones

[0048] En vista de lo anterior, la presente invención suministra en un aspecto un a composición que comprende un complejo no covalente de:

- a) una estructura positivamente cargada;
- b) al menos dos miembros seleccionados del grupo que consiste de:
 - i) una primera estructura cargada negativamente que tiene una prioridad de porciones de imagen unidas; o alternatively una pluralidad de porciones de imagen cargadas negativamente;

ii) una segunda estructura cargada negativamente una pluralidad de agentes de blanco unidos; o alternativamente una pluralidad de porciones de blanco cargadas negativamente,

iii) al menos un miembro seleccionado de ARN, ADN, ribosomas, ácidos oligonucleicos modificados y cADN que codifica un transgen seleccionado;

iv) ADN que codifica al menos un factor de persistencia.

v) una tercer estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes biológicos unidos o un agente biológico cargado negativamente,

en donde el complejo lleva una carga positiva neta y al menos uno d ellos miembros se selecciona de i), ii) iii) o v).

[0049] En un grupo de modalidades, la composición comprende al menos tres miembros seleccionados de los grupos i) hasta v). En otro grupo de modalidades, la composición comprende al menos un miembro de cada uno de los grupos i), ii), iii), o iv). En aún otro lado grupo de modalidades, la composición comprende al menos un miembro de cada uno de los grupos i), ii). En otro grupo de modalidades la composición comprende al menos un miembro de cada uno de los grupo sii), iii) y iv).

[0050] Preferiblemente la estructura cargada positivamente tiene una longitud desde aproximadamente 1 a 4 veces las longitudes combinadas de los miembros del grupo b). Alternativamente la estructura cargada positivamente tiene una proporción de carga desde aproximadamente 1 a cuatro veces la carga combinada de los miembros de grupo b). En algunas modalidades, la densidad de carga es uniforme y a longitud y proporción de carga es aproximadamente la misma. Las proporciones tamaño a tamaño (longitud) se pueden determinar con

base en estudios moleculares de los componentes o se pueden determinar de las masas de los componentes.

[0051] Por "positivamente cargado" significa que el vehículo tiene una carga positiva bajo al menos algunas de las condiciones de solución – fase, más preferiblemente al menos bajo algunas de las condiciones fisiológicamente compatibles. Más específicamente, "positivamente cargadas" como se utiliza aquí, significa que el grupo en cuestión contiene funcionalidades que son cargadas 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 solución – fase, tal como cambios de pH en el caso de aminas primarias. Más preferiblemente, "positivamente cargadas" como se utiliza aquí se refiere a aquellas que tienen el comportamiento de asociarse con aniones bajo condiciones fisiológicamente compatibles. Los polímeros con una multiplicidad de porciones positivamente cargadas no necesitan ser homopolímeros, como será evidente para un experto en la técnica. Otros ejemplos de porciones positivamente cargadas son bien conocidas en la técnica anterior y se pueden emplear fácilmente como será evidente para aquellos expertos en la técnica. Los vehículos positivamente cargados descritos en esta invención que ellos mismos no tienen una actividad terapéutica son compuestos novedosos que tienen utilidad por ejemplo en composiciones y métodos como se describen aquí. Así, en otro aspecto de la presente invención, nosotros detallamos estos compuestos novedosos que incluyen cualquier vehículo que comprende una estructura positivamente cargada que tiene unido grupos ramificados positivamente cargados como se describe aquí y que no tienen en si mismo una actividad biológica terapéutica. La invención excluye específicamente los fragmentos de anticuerpo que no tienen actividad biológica diferente a solamente unir el antígeno específico

cuando el término "terapéutico" "proteína biológicamente activa" se emplea En razón a que los antígenos adecuados para la inmunización tienen otras actividades biológicas tales como montar una respuesta inmune, estos permanecen incluidos en los aspectos apropiados de ésta invención, sin embargo. Más aún los agentes que tienen una actividad biológica o un efecto terapéutico al unirse a un antígeno específico como bloquean de esta manera la unión de ligando o altera la conformación del antígeno que están incluidos en esta invención.

[0052] En otra modalidad, la presente invención suministra en un aspecto una composición que comprende un agente biológicamente activo tal como, por ejemplo, insulina, toxina de botulinum, una proteína terapéutica que no altera terapéuticamente los niveles de glucosa en la sangre, un agente terapéutico sin proteína sin ácido nucleico tal como ciertos antifúngicos o alternativamente un agente para inmunización y un vehículo que comprende una estructura positivamente cargada, por ejemplo un polímero de polipéptido o no peptídico positivamente cargado, que puede ser hetero o homopolímero, tal como una polialquilenoimina, el polipéptido o polímero no peptídico que tiene una ramificación positivamente cargada o grupos "eficiencia" como se definieron aquí Cada una de las terapéuticas basadas en proteína y las terapéuticas sin ácido nucleico sin proteína tienen diferentes propiedades fisicoquímicas que alteran las características de complejo total Tales vehículos cargados positivamente están entre los materiales descritos adelante como estructuras positivamente cargadas, La invención también suministra un método para administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente biológicamente activo como se mencionó aquí, que comprende aplicar a la piel o al epitelio del sujeto (que puede ser un humano u otro mamífero) un agente biológicamente activo y una cantidad de la

estructura positivamente cargada que tienen grupos ramificados que es efectivo para suministrar suministro transdérmico de el agente biológicamente al sujeto. En este método, el agente biológicamente activo y el vehículo positivamente cargado se puede aplicar como una composición de pre mezcla, o se pueden aplicar separadamente a la piel o epitelio (por ejemplo el agente puede estar en un parche de piel u otro dispositivo y el vehículo puede estar contenido en un líquido u otro tipo de composición que se aplica a la piel antes de la aplicación del parche para piel). Como se utiliza aquí, la palabra "terapéutico" en el contexto de glucosa de sangre se refiere a un declinar en los niveles de glucosa de la sangre suficientes para aliviar los síntomas agudos o signos de la hiperglicemia, por ejemplo en pacientes diabéticos. En ciertos aspectos de la invención, el suministro transdérmico de una proteína terapéutica capaz de lograr las alteraciones terapéuticas de la glucosa de la sangre se excluyen específicamente. La invención específicamente excluye fragmentos de anticuerpo que no tengan actividad biológica diferente de solamente unir un antígeno específico cuando el término "terapéutico" o "proteína biológicamente activa" se emplea. En razón a que los antígenos adecuados para la inmunización tienen otras actividades biológicas tales como montar una respuesta inmune, estas permanecen incluidas en los aspectos apropiados de esta invención, sin embargo. Más aún, los agentes que tienen una actividad biológica o un efecto terapéutico al unir un antígeno específico, bloquean de esta manera la unión de ligando o alteran la conformación del antígeno que están incluidos en esta invención. Como se emplea aquí, los agentes antígenos adecuados para la inmunización pueden ser antígenos basados en proteína que no alteran terapéuticamente los niveles de glucosas en la sangre, los agentes sin proteína sin ácido nucleico o los híbridos de éstos. Los ácidos nucleicos que codifican los antígenos son específicamente no adecuados para las composiciones de la presente invención, sin embargo. Así, los agentes

incluidos son ellos mismos antígenos adecuados para la inmunización. Los antígenos adecuados incluyen, por ejemplo, aquellos para los agentes ambientales, los patógenos o los biorriesgos. Los agentes adecuados preferiblemente incluyen, por ejemplo, antígenos relacionados con el botulismo, malaria, rabias, ántrax, tuberculosis, o relacionados con inmunizaciones de la infancia tales como la hepatitis B, difteria, pertusis, tétano, hemófilos, influenza tipo b, poliovirus inactivado, viruela, parotitis, rubéola, varicela, neumococos, hepatitis A, influenza.

Estructura positivamente cargada

[0053] La estructura positivamente cargada (también denominada como "vehículo" positivamente cargado) es típicamente una cadena lineal de átomos, bien sea con grupos en la cadena que lleva una carga positiva a pH fisiológico, o con grupos que llevan una carga positiva unida a cadenas laterales que se extienden desde la estructura. Preferiblemente, la estructura cargada positivamente misma no tendrá una actividad enzimática biológica definida. La estructura lineal es una estructura de hidrocarburo que es, en algunas modalidades, interrumpida por los heteroátomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno, azufre, silicio y fósforo. La mayoría de los átomos de la cadena de estructura son usualmente carbono. Adicionalmente, la estructura será a menudo un polímero de unidades repetidas (por ejemplo aminoácidos, poli(etilenoóxido), poli(propilenoamina), polialquilenoamina, y similares). En un grupo de modalidades, la estructura positivamente cargada es una polipropilenoamina en donde un número de átomos de nitrógeno amina están presentes como grupos amonio (tetra-sustituido) que llevan una carga positiva. En otra modalidad, la estructura positivamente cargada es un polímero no peptídico, el cual puede ser un hetero u

homopolímero, tal como una polialquilenimina, por ejemplo una polietilenimina o polipropilenimina que tiene un peso molecular desde aproximadamente 10,000 a aproximadamente 2,500,000 preferiblemente desde aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,800,000 y más preferiblemente desde aproximadamente 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 positivamente cargados (por ejemplo grupos amonio, grupos piridino, grupos fosfonio, grupos sulfonio, grupos guanidinio, o grupos amidinio) Las porciones de cadena lateral en este grupo de modalidades se puede colocar en espacios a lo largo de la estructura que son consistentes en separaciones o variable. Adicionalmente, la longitud de las cadenas laterales puede ser similar o no similar. Por ejemplo, en un grupo de modalidades las cadenas laterales pueden ser cadenas de hidrocarburos lineales o ramificados que tienen desde uno a 20 átomos de carbono y que terminan en el extremo distante (alejada de la estructura) en uno de los grupos cargados positivamente anteriormente anotados. En todos los aspectos de la presente invención, el asocio entre el vehículo y el agente biológicamente activo es mediante interacción no covalente, el cual puede incluir, por ejemplo, interacciones iónicas, unión de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, o combinaciones de éstos.

[0054] En un grupo de modalidades, la estructura positivamente cargada es un polipéptido que tiene grupos múltiples de cadena lateral positivamente cargados (por ejemplo, lisina, arginina, ornitina, homoarginina, y similares). Preferiblemente, el polipéptido tiene un peso molecular de desde aproximadamente 10,000 a aproximadamente 1,500,000, más preferiblemente desde aproximadamente 25,000 a aproximadamente 1,200,000, más preferiblemente desde aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,000,000

Un experto en la técnica apreciará que cuando los aminoácidos son utilizados 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.

[0055] Alternativamente, la estructura puede ser análoga de un polipéptido tal como un peptóide. Ver, por ejemplo, Kessler, *Angew. Chem Int. Ed. Engl.* 32:543 (1993), Zuckermann et al. *Chemtracts-Macromol. Chem.* 4:80 (1992); y Simon et al. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89:9367 (1992). En resumen, un peptóide es una poliglicina en la cual la cadena lateral esta unida a átomos de nitrógeno de la estructura en lugar de a átomos de carbono α . Como anteriormente, una porción de las cadenas laterales terminarán típicamente en un grupo cargado positivamente para suministrar un componente de estructura positivamente cargado. La síntesis de peptoides se describe en, por ejemplo, la Patente U.S No 5,877,278. Como es utilizado el termino aquí, estructuras positivamente cargadas que tienen una construcción de estructura peptóide son consideradas "no péptido" en la medida en que ellas no están compuestas de aminoácidos que tengan cadenas laterales de ocurrencia natural en los sitios de carbono α .

[0056] Una variedad de otras estructuras se pueden utilizar empleando, por ejemplo, mímicos estéricos o electrónicos de polipéptidos en donde los enlaces amida del péptido son reemplazados con subrogados tales como enlaces ester, tio amidas (-CSNH-), tio amidas inversas (-NHCS-), amino metileno (-NHCH₂-) o grupos metileno amino inversos (-CH₂NH-), grupos seto metileno (-COCH₂-), fosfinado (-PO₂RCH₂-), fosfonamidato y éster fosfonamidato (-PO₂RNH-), péptido inverso (-NHCO-), trans-alqueno (-CR=CH-), fluoro alqueno (-CF=CH-), di metileno (-CH₂CH₂), tio éter (-CH₂S), hidroxietileno (-CH(OH)CH₂), metilenoxi (-CH₂O-), tetrazol (CN₄), sulfonamido (-SO₂NH-), metilenosulfonamido (-CHRSO₂NH-),

sulfonamida inversa (-NHSO₂), y estructuras con subunidades malo nato y/o gem-diamino-alquilo, por ejemplo, como se vio en Fletcher et al. ((1998) Chem Rev. 98:763) y se detalló mediante las referencias citadas allí. Muchas de las sustituciones anteriores resultan en estructuras de polímero aproximadamente isostéricas con relación a las estructuras formadas de los amino ácidos α.

[0057] En cada una de las estructuras suministradas anteriormente, los grupos de cadena lateral se pueden depender para que lleven un grupo positivamente cargado. Por ejemplo, las estructuras ligadas a sulfonamida (-SO₂NH - y - NHSO₂ -) pueden tener grupos de cadenas laterales unidos a los átomos de nitrógeno. Similarmente, el enlace hidroxietileno (-CH(OH)CH₂) puede llevar un grupo de cadena lateral unido al sustituyente hidroxilo. Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente las otras químicas de enlace para suministrar grupos de cadena lateral positivamente cargados utilizando métodos sintéticos estándar.

[0058] En una modalidad particularmente preferida, la estructura positivamente cargada es un polipéptido que tiene grupos ramificados (también denominados como grupos eficiencia) independientemente seleccionados de - (gly)_{n1}-(arg)_{n2}, HIV-TAT o fragmentos de estos, o dominio de transducción de proteína de Antennapedia, o un fragmento o mezcla de estos, en los cuales el subíndice n1 es un entero de 0 a 20, más preferiblemente 0 a 8, aún más preferiblemente 2 a 5, y el subíndice n2 es independientemente un número impar de desde aproximadamente 5 a aproximadamente 25, más preferiblemente aproximadamente 7 a aproximadamente 17, más preferiblemente aproximadamente 7 a aproximadamente 13. Aún adicionalmente preferidas son aquellas modalidades en las cuales el fragmento HIV-TAT tiene la fórmula (gly)_p-

RGRDDRRQRRR-(gly)_q, (gly)_p-YGRKKRRQRRR-(gly)_q o (gly)_p-RKKRRQRRR-(gly)_q en donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un entero de 0 a 20 y el fragmento esta unido a la estructura por vía de un terminal C o el N-terminal del fragmento. Los fragmentos HIV-TAT preferidos son aquellos en los cuales los subíndices p y q son cada uno enteros independientes de 0 a 8, más preferiblemente 2 a 5. En otra modalidad preferida la cadena lateral cargada positivamente o el grupo ramificado es el dominio de transducción de la proteína Antennapedia (Antp) (PTD), o un fragmento de esta que retiene actividad. Preferiblemente el vehículo positivamente cargado incluye grupos ramificados de cadena lateral positivamente cargados en una cantidad de al menos aproximadamente 0.05%, como un porcentaje del peso del vehículo total, preferiblemente desde aproximadamente 0.05 a aproximadamente 45% en peso, y más preferiblemente desde aproximadamente 0.1 a aproximadamente 30% en peso. Por grupos ramificados positivamente cargados que tienen la fórmula $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, la cantidad más preferida va desde aproximadamente 0.1 a aproximadamente 25%.

[0059] En otra modalidad particularmente preferida, la porción de estructura es una polilisina y los grupos ramificados positivamente cargados están unidos a los grupos amino de cadena lateral de lisina. La polilisina utilizada en esta modalidad particularmente preferida tiene un peso molecular de desde aproximadamente 10,000 a aproximadamente 1,500,000, preferiblemente desde aproximadamente 25,000 a aproximadamente 1,200,000, y más preferiblemente desde aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,000,000. Esta puede ser cualquiera de las polilisinas comercialmente disponibles (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA) tal como, por ejemplo, la polilisina que tiene un PM >70,000, la polilisina que tiene un PM de 70,000 a 150,000, la polilisina que

tiene un PM de 150,000 a 300,000 y la polilisina que tiene un PM > 300,000. La selección apropiada de una polilisina dependerá de los componentes restantes de la composición y serán suficientes para suministrar una carga positiva neta total a la composición y suministrar una longitud que sea preferiblemente de una a cuatro veces la longitud combinada de los componentes de los componentes negativamente cargados. Los grupos ramificados positivamente cargados preferidos o los grupos eficiencia incluyen, por ejemplo, -gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg-arg-arg (-Gly₃Arg₇) o HIV-TAT. En otra modalidad preferida la estructura positivamente cargada es una polialquilenimina de cadena larga tal como una polietilenoimina, por ejemplo, una que tiene el peso molecular de aproximadamente 1, 000,000.

[0060] La estructura positivamente cargada o las moléculas del vehículo comprenden polímeros polipéptidos o no peptídicos tales como polialquileniminas u otras estructuras positivamente cargadas mencionadas anteriormente, que tienen los grupos ramificados descritos anteriormente, son compuestos novedosos y forman un aspecto de esta invención.

[0061] En una modalidad de la invención, solamente un vehículo positivamente cargado que tiene los grupos ramificados positivamente cargados es necesaria para el suministro transdérmico de la sustancia activa. En una modalidad de este caso el vehículo positivamente cargado es un polipéptido (por ejemplo, lisina, arginina, ornitina, homoarginina, y similares) que tiene grupos de cadena lateral positivamente cargados múltiples, como se describió anteriormente. Preferiblemente, el polipéptido tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 10,000. En otra modalidad de este caso el vehículo positivamente cargado es un polímero no peptídico tal como una polialquilenimina

que tiene grupos de cadena lateral múltiples positivamente cargados que tienen un peso molecular de al menos aproximadamente 100,000. Tales polialquilenioimas incluyen polietileno y polipropilenoimas. En cualquier caso, para uso como agente necesario solo para suministro transdérmico, la molécula del vehículo positivamente cargada incluye grupos ramificados o de eficiencia positivamente cargados, que comprenden $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, en el cual el subíndice $n1$ es un entero de 0 a 20, más preferiblemente 0 a 8, aún más preferiblemente 2 a 5, y el subíndice $n2$ es independientemente un número impar de desde aproximadamente 5 a 25, más preferiblemente desde aproximadamente 7 a aproximadamente 17, y más preferiblemente desde aproximadamente 7 a aproximadamente 13, el HIV-TAT o fragmento de este, o una Antennapedia PTD o un fragmento de esta. Preferiblemente los grupos de cadena lateral o ramificados que tiene la fórmula general $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ como se describió anteriormente. Otras modalidades preferidas son aquellas en las cuales los grupos ramificados o de eficiencia que 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 y el fragmento está unido a la molécula del vehículo por vía de su terminal C o de su terminal N del fragmento. Los grupos laterales ramificados que tienen la forma D o L (configuración R o S) en el centro de la unión. Los fragmentos HIV-TAT preferidos son aquellos en los cuales los subíndices p y q son cada uno enteros independientemente de 0 a 8, más preferiblemente 2 a 5. Otras modalidades preferidas son aquellas en las cuales los grupos ramificados son grupos Antennapedia PTD o fragmentos de estos que retiene la actividad del grupo. Estos son conocidos en la técnica, por ejemplo, de Console et al., J. Biol. Chem. 278:35109 (2003).

[0062] En una modalidad particularmente preferida, el vehículo es una polilisina con grupos ramificados positivamente cargados unidos a los grupos amino laterales de cadena de lisina. La polilisina utilizada en esta modalidad particularmente preferida puede ser cualquiera disponible comercialmente (Sigma Chemical Company, St Louis, Missouri, USA, por ejemplo) las polilisinas tales como, por ejemplo, la polilisina que tiene un PM >70,000, la polilisina que tiene un PM de 70,000 a 150,000, la polilisina que tiene un PM de 150,000 a 300,000 y la polilisina que tiene un PM > 300,000 Sin embargo, preferiblemente la polilisina tiene un PM de al menos aproximadamente 10,000. Los grupos ramificados positivamente cargados preferidos o los grupos de eficiencia incluyen, por ejemplo, -gly-gly-gly-arg-arg-arg-arg-arg-arg (-Gly₃Arg₇), HIV-TAT o fragmentos de éste, y Antennapedia PTD o fragmentos de estos.

Otros componentes

[0063] Además del componente de estructura positivamente cargado, las composiciones multicomponente de la presente invención comprenden al menos dos componentes del grupo que consiste de lo siguiente.

i) Una primera estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de porciones de imágenes unidas; o alternatively una pluralidad de porciones de imágenes cargadas negativamente;

ii) Una segunda estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes blanco unidos; o alternatively una pluralidad de porciones blanco cargadas negativamente;

iii) Al menos un miembro seleccionado de ARN, ADN, ribosomas, ácidos oligonucleicos modificados y CADN que codifica un transgen seleccionado;

iv) El ADN que codifica al menos un factor de persistencia, y

v) Una tercera estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes biológicos unidos, o un agente biológico cargado negativamente.

[0064] En un aspecto relacionado, como se describió aquí, en algunas modalidades o composiciones de esta invención, la estructura positivamente cargada o vehículo se puede utilizar sola para proporcionar suministro transdérmico de ciertos tipos de sustancias. Las combinaciones de los agentes biológicamente activos descritas aquí tales como, por ejemplo, las combinaciones de insulina, toxina de botulinum, proteínas que no alteran terapéuticamente los niveles de glucosa en la sangre, antígenos adecuados para inmunización, o agentes sin proteína sin ácido nucleico, también se pueden emplear en estas composiciones

[0065] Las estructuras cargadas negativamente, cuando se utilizan para llevar las porciones de imagen, las porciones de blanco y los agentes terapéuticos, pueden ser una variedad de estructuras (similares a aquellas descritas anteriormente) que tienen grupos múltiples que llevan una carga negativa a un pH fisiológico. Alternativamente, las porciones de imagen, las porciones de blanco y los agentes terapéuticos con porciones negativamente cargadas con superficie suficiente no requerirán la unión de una estructura adicional para el complejo iónico con las estructuras positivamente cargadas como será fácilmente evidente

para aquellos expertos en la técnica. Suficiente en este contexto implica que la densidad adecuada de los grupos cargados negativamente esta presente sobre la superficie de las porciones de imagen, las porciones de blanco o los agentes terapéuticos para lograr una unión iónica con las estructuras positivamente cargadas descritas anteriormente. En estos casos, la sustancia o derivado de este tiene un carga suficiente negativa para asociarse con los vehículos positivamente cargados de la presente invención no covalentemente. El término "suficiente" en este contexto se puede determinar por ejemplo mediante un cambio en el tamaño de la partícula o espectrofotometría funcional versus los componentes solos. Los grupos negativamente cargados adecuados son ácidos carboxílicos, ácidos fosfinicos, fosfónicos o fosfóricos, ácidos sulfinico o sulfónico y similares. En algunas modalidades, la estructura negativamente cargada será un oligonucleótido. En otras modalidades, la estructura negativamente cargada es un oligosacárido (por ejemplo, dextrano). En aún otras modalidades, la estructura negativamente cargada es un polipéptido (por ejemplo, ácido poli glutámico, ácido poli aspártico, o un polipéptido en el cual los residuos de ácido glutámico o ácido aspártico son interrumpidos por amino ácidos no cargados). Las porciones descritas con mas detalle adelante (porciones de imagen, agentes blanco, y agentes terapéuticos) se pueden unir a una estructura que tiene estos grupos pendientes, típicamente por vía de enlaces éster. Alternativamente, los amino ácidos que interrumpen los amino ácidos cargados negativamente o son apéndices de los terminales de la estructura cargada negativamente, se pueden utilizar para unir porciones de imágenes y porciones blanco por vía, por ejemplo, de enlaces di sulfuro (a través de un residuo de cisteína), enlaces de amida, otros enlaces (a través de serina o grupos hidroxilo treonina) y similares. Alternativamente, las porciones de imagen y las porciones de blanco pueden ser ellas mismas pequeños aviones en la ausencia de un polímero cargado

negativamente. Alternativamente, las porciones de imagen, las porciones de blanco y los agentes terapéuticos pueden ser ellos mismos covalentemente modificados para lograr porciones cargadas negativamente de superficie suficiente para los complejos iónicos con las estructuras positivamente cargadas como se da fácilmente evidente a un experto en la técnica. En ambos casos, la sustancia o un derivado de esta tiene una carga suficiente negativa para asociarse con los vehículos positivamente cargados de la presente invención no covalentemente. El término "suficiente" en este contexto se refiere a una asociación que se puede determinar por ejemplo mediante cambio en el tamaño de partícula o espectrofotometría funcional versus los componentes solos.

Porciones de imagen

[0066] Una variedad de porciones de diagnóstico o imágenes son útiles en la presente invención y están presentes en una cantidad efectiva que dependerá de la condición que es diagnosticada o que es puesta en imagen, la ruta de administración, la sensibilidad del agente y el dispositivo utilizado para la detección del agente, y similar.

[0067] Ejemplos de imágenes adecuadas o agentes de diagnóstico incluyen agentes de contraste radio opaco, agentes de contraste paramagnético, agentes de contraste súper paramagnético, porciones de imágenes ópticas, agentes de contraste CT y otros agentes de contraste. Por ejemplo, agentes de contraste radio opaco (para imágenes de rayos x) incluirán compuestos de yodo inorgánico y orgánico (por ejemplo, diatrizoato), metales radio opacos y sus sales (por ejemplo, plata, oro, platino y similares) y otros compuestos radio opacos (por ejemplo, sales de calcio, sales de bario tales como sulfato de bario, tántalo y óxido

de tántalo). Los agentes de contraste paramagnético adecuados (para imágenes MR) incluyen ácido tri amino penta acético di etileno gadolinio (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-tetra asa ciclo do decano- N, N',N'',N''' – tétra acético (DOTA), ácido etileno di amino tetra acético (EDTA), 1, 4, 7, 10-tetra asa ciclo do decano- N, N',N'' – tri acético (DO3A) ácido 1, 4, 7-tri asa ciclo nonano- N, N',N'' – tri acético (NOTA), ácido 1, 4, 8, 11-tetra asa ciclo tera decano- N, N',N'',N''' – tetra acético (TETA), ácido hidroxil bencil etileno di amina di acético (HBED) y similares. Los agentes contrastes súper paramagnéticos adecuados (para imágenes MR) incluyen magnetitos, óxidos de hierro súper paramagnéticos, óxidos de hierro mono cristalinos, formas particularmente en complejo de cada uno de estos agentes que se pueden unir a una estructura negativamente cargada. Aún otros agentes de imágenes adecuados son los agentes de contraste CT que incluyen agentes de contraste CT yodados y no yodados y iónicos y no iónicos, así como también agentes de contraste tales como "spin-labels" u otros agentes diagnósticamente efectivos. Los agentes de imágenes ópticas adecuados incluyen por ejemplo el grupo que consiste de Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, Oregon green 488, Oregon green 500, Oregon green 514, proteína fluorescente Green, 6-FAM, Texas Red, Hex, TET, y HAMRA.

[0068] Otros ejemplos de agentes diagnósticos incluyen genes marcadores que codifican proteínas que son fácilmente detectables cuando se expresan en una célula, que incluyen, pero no están limitados a, β -galactosidasa, proteína fluorescente verde, proteína fluorescente azul, luciferasa y similares. Una amplia variedad de marcadores se pueden emplear, tales como radionuclidos, flúor, enzimas, sustratos de encima, cofactores de encima, inhibidores de encima,

ligandos (particularmente aptenos), y similares. Aún otras sustancias útiles son aquellas marcadas con especies radio activas o componentes, tales como ^{99m}Tc glucoheptonato

[0069] La elección para unir una porción de imagen a una estructura negativamente cargada dependerá de una variedad de condiciones. Ciertos agentes de imágenes son neutros a pH fisiológico y preferiblemente estarán unidos a una estructura negativamente cargada o covalentemente modificada para incluir las porciones negativamente cargadas suficientes anteriores para retener un complejo con el vehículo positivamente cargado. Otros agentes de imagen llevan carga negativa suficiente para retener el complejo con el vehículo positivamente cargado, aún en ausencia de una estructura negativamente cargada. En estos casos, la sustancia o un derivado de esta tiene una carga negativa suficiente para asociarse con los vehículos positivamente cargados de la presente invención no covalentemente. El término "suficiente" en este contexto se refiere a una asociación que se puede determinar por ejemplo mediante el cambio en el tamaño de la partícula o la espectrofotometría funcional versus los componentes solos. Los ejemplos de tales porciones de imágenes cargadas negativamente incluyen el ión fosfato (útiles para imágenes de resonancia magnética).

Agentes blanco

[0070] Una variedad de agentes blanco son útiles en las composiciones descritas aquí. Típicamente, los agentes blanco están unidos a una estructura negativamente cargada como se describe para las porciones de imágenes anteriores. En ciertas modalidades, los agentes blanco y las porciones de imagen

son estructural y/o químicamente distintas. Por ejemplo, las porciones de imagen y los agentes blanco son ambos no fosfato. De manera general, los agentes blanco pueden ser cualquier elemento que hace posible dirigir la transferencia de un ácido nucleico, agente terapéutico u otro componente de la composición a un sitio particular para alterar el tropismo del complejo con relación a aquel del complejo sin el agente blanco. El agente blanco puede ser un agente blanco extra celular, que permite, por ejemplo, transferir un ácido nucleico para ser dirigido hacia ciertos tipos de células o ciertos tejidos deseados (células tumorales, células de hígado, células hematopoyéticas, y similares). Tale agente también puede ser un agente blanco intracelular, que permita a un agente terapéutico ser dirigido hacia compartimentos de célula particulares (por ejemplo, mitocondria, núcleo, y similares). El agente más simplemente también puede ser un anión pequeño el cual, en virtud o al cambiar la distribución de carga neta altera el tropismo del complejo más desde superficies de célula más altamente negativas y componentes de matriz extra celular a una amplia variedad de células o aún específicamente alejada de la mayoría de las superficies altamente negativas.

[0071] El agente blanco o los agentes son preferiblemente ligados, covalentemente o no covalentemente, a una estructura cargada negativamente de acuerdo con la invención. de acuerdo con un modo preferido de la invención, el agente blanco esta covalentemente unido a un ácido oligonucleico, poliaspartato, dextrano sulfatado o fosforilado y similar que sirve como un componente de estructura cargado negativamente, preferiblemente por vía de un grupo de enlace. Los métodos para unir agentes blanco (así como también otros agentes biológicos) a los ácidos nucleicos son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica utilizando, por ejemplo, grupos de enlace heterobifuncional (ver Pierce Chemical Catalog). En un grupo de modalidades, el agente blanco es un péptido

fusogénico para la promover la transfección celular, es decir, para favorecer el paso de la composición o sus varios elementos a través de membranas, o para ayudar en el egreso de endosómas y para cruzar la membrana nuclear. El agente blanco también puede ser un ligando receptor para un receptor que esta presente en la superficie del tipo de célula, tal como, por ejemplo, un azúcar, transferina, insulina o proteína asialo-orosomucoide. Tal ligando puede ser uno de un tipo intracelular, tal como una señal de localización nuclear (nls) secuencia que promueve la acumulación de ADN transfectado dentro del núcleo.

[0072] Otros agentes blanco útiles en el contexto de la invención, incluyen azúcares, péptidos, hormonas, vitaminas, citosinas, ácidos oligonucleicos, aniones pequeños, lípidos o secuencias o fracciones derivadas de estos elementos y que permiten la unión específica con sus receptores correspondientes. Preferiblemente, los agentes blanco son azúcares y/o péptidos tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, ligandos de receptor de célula o fragmentos de estos, los receptores o los fragmentos receptores, y similares. Más preferiblemente, los agentes blanco son ligandos de receptores de factor de crecimiento, de receptores de citosina, o de receptores de lectina de célula o de receptores de proteína de adhesión. El agente blanco también puede ser un azúcar que hace posible apuntar a las lectinas tales como los receptores asialoglicoproteína, o alternativamente un fragmento de fab de anticuerpo que hace posible apuntar al receptor de fragmento Fc de las inmunoglobulinas.

[0073] En aún otras modalidades, un agente blanco es utilizado en ausencia de una estructura negativamente cargada. En este grupo de modalidades, el agente blanco lleva porciones suficientes negativamente cargadas para retener el complejo iónico con el vehículo positivamente cargado descrito anteriormente. En

estos casos, la sustancia o un derivado de ésta tiene una carga negativa suficiente para asociarse con los vehículos positivamente cargados de la presente invención no covalentemente. El término "suficiente" en este contexto se refiere a un asocio que se puede determinar por ejemplo al cambiar el tamaño de partícula o la espectrofotometría funcional versus los componentes solos. Los agentes blanco negativamente cargados adecuados para este grupo de modalidades son agentes blanco basados en proteína que tienen una carga negativa neta a un pH fisiológico, así como también los agentes blanco que puedan facilitar la adhesión a una superficie celular particular, tal como poli aniones pequeños que incluyen por ejemplo, fosfato, aspartato y citrato que pueden por ejemplo cambiar un blanco con base en la carga de superficie neta de la célula ha ser blanco.

[0074] En las composiciones de la presente invención, el ácido nucleico puede ser cualquier ácido desoxirribunucleico o una ácido ribunocléico, y pueden comprender secuencias de origen natural o artificial. Más particularmente, los ácidos nucleicos utilizados aquí pueden incluir ADN genómico cADN, mRNA, tARN, rARN, secuencias híbridas o secuencias sintéticas o semi-sintéticas. Estos ácidos nucleicos pueden ser de origen humano, animal, vegetal, bacterial, viral, etc. Adicionalmente, los ácidos nucleicos se pueden obtener mediante cualquier técnica conocida por aquellos expertos en la técnica, y en particular al seleccionar los bancos, mediante síntesis química o mediante métodos mezclados que incluyen la modificación química o enzimática de secuencias obtenidas al seleccionar los bancos. Aún adicionalmente, los ácidos nucleicos se pueden incorporar en vectores, tales como, vectores de plásmido.

[0075] Los ácidos desoxirribunucleicos utilizados en la presente invención pueden ser de hebra simple o doble. Estos ácidos desoxirribunucleicos también se

pueden codificar para genes terapéuticos, secuencias para regular la transcripción o replicación, secuencias contra sentido, regiones para unirse a otros componentes de célula, etc. Los genes terapéuticos adecuados son esencialmente cualquier gen que codifica para un producto de proteína que tiene un efecto terapéutico. El producto de proteína así codificado puede ser una proteína, polipéptido, un péptido, o similar. El producto de proteína puede, en algunos casos, ser homólogo con respecto a la célula blanco (es decir un producto que es normalmente expresado en la célula blanco cuando el último no exhibe patología). De esta manera, el uso de ácidos nucleicos adecuados puede incrementar la expresión de una proteína, haciendo posible, por ejemplo, solucionar una expresión insuficiente en la célula. Alternativamente, la presente invención suministra composiciones y métodos para la expresión de una proteína que es inactiva o débilmente activa debido a una modificación, o alternativamente de sobre expresar la proteína. El gen terapéutico puede así codificar un mutante de una proteína de célula, que tiene una estabilidad incrementada, actividad modificada, etc. El producto de proteína también puede ser heterólogo con respecto a la célula blanco. En este caso, una proteína expresada puede, por ejemplo, hacer o suministrar una actividad que sea deficiente en la célula, posibilitando combatir una patología o estimular una respuesta inmune.

[0076] Más particularmente, los ácidos nucleicos útiles en la presente invención son aquellos que codifican para enzimas, derivados de sangre, hormonas, linfocinas, Inter leucinas, interferones, TNF, factores de crecimiento, neurotransmisores o sus precursores o enzimas sintéticas, o los factores tróficos: BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, VEGF, NT3, NT5, HARP/pleiotrofina; las proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos, de los tipos apolipoproteína seleccionados de apolipoproteína A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III,

D, E, F, G, H, J y apo(a), enzimas metabólicas tales como, por ejemplo, lipasa lipoproteína, lipasa hepática, lecitin colesterol aciltransferasa, 7- α -cloesterol hidroxilaza, fosfataza de ácido fosfatídico, o proteínas de transferencia de lípido tales como proteína de transferencia de éster de colesterol y proteína de transferencia de fosfolípido, una proteína para unir HDL o un receptor seleccionado de, por ejemplo, receptores LDL, receptores remanentes quilo micrón y receptores de absorbedores, distrofina o minidistrofina, proteína GAX, proteína CFTR asociada con mucoviscidosis, genes supresores de tumor. p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev; factores de proteína involucrados en la coagulación: factores VII, VIII, IX; o los ácidos nucleicos pueden ser aquellos genes involucrados en la reparación de ADN, genes suicidio (timidina quinaza, citosina diaminaza), genes que codifican trombomodulina, α 1-antitripsina, activador de plasminógeno de tejido, dismutaza, súper óxido, elastaza, matriz de metalo proteinaza, y similares.

[0077] Los genes terapéuticos útiles en la presente invención también pueden ser una secuencia contra sentido o un gen cuya expresión en las células blanco hace posible controlar la expresión de genes de la transcripción del mRNA celular. Tales secuencias pueden, por ejemplo, ser transcritas en la célula blanco en ARN complementario del mRNA celular y así bloquear su translación en la proteína, de acuerdo con la técnica descrita en la patente EP 140,308. Las secuencias contra sentido también comprenden las secuencias que codifican para ribosomas que son capaces de destruir selectivamente el ARN blanco (ver EP 321,201)

[0078] Como se indica anteriormente, el agente biológicamente activo puede también comprender uno o más péptidos antigénicos que son capaces de

generar una respuesta inmune en humanos o animales. En esta modalidad particular, la invención hace posible producir vacunas o tratamientos inmunoterapéuticos aplicados a humanos o animales, en particular contra micro organismos, virus o cánceres. Ellos pueden en particular ser péptidos antigénicos específicos para el virus de Epstein-Barr, para el virus del VIH, para el virus de la hepatitis B (ver EP 185,573), para los virus de pseudo-rabia o alternativamente específicos para tumores (ver EP 259,212).

[0079] Preferiblemente, el ácido nucleico también comprende secuencias que permiten la expresión del gen terapéutico y/o del gen que codifica el péptido antigénico en la célula u órgano deseado. Estas pueden ser secuencias que son naturalmente responsables por la expresión del gen considerado cuando estas secuencias son capaces de funcionar en la célula infectada. Los ácidos nucleicos también pueden ser secuencias de diferente origen (responsables por la expresión de otras proteínas, o aún proteínas sintéticas). En particular, los ácidos nucleicos pueden contener secuencias promotoras para genes eucarióticos o virales. Por ejemplo, las secuencias promotoras pueden ser aquellas derivadas del genoma de la célula que se desea que se infecte. Similantemente, las secuencias promotoras se pueden derivar del genoma de un virus, por ejemplo, los promotores de los genes EIA, MLP, CMV, RSV, etc. Además, estas secuencias de expresión se pueden modificar mediante la adición de secuencias de activación, secuencias de regulación, etc.

[0080] Más aún, el ácido nucleico también puede contener, en particular corriente arriba del gen terapéutico, una secuencia de señal que dirige el producto terapéutico sintetizado en las sendas de secreción de la célula blanco. Esta secuencia de señal puede ser la secuencia de señal natural o el producto

terapéutico, pero también puede ser cualquier otra secuencia de señal funcional, o una secuencia de señal artificial.

ADN que codifica al menos un factor de persistencia

[0081] En algunas modalidades, la composición también comprenderá ADN que codifica al menos un factor de persistencia. Ejemplos de tales ADN es el ADN que codifica la proteína 1 preterminal adenoviral (ver, Lieber, et al. Nature Biotechnology 15(13):1383-1387 (1997)). La proteína preterminal adenoviral 1 o el ácido nucleico que la codifica se puede suministrar en -cis o trans- a la secuencia de ácido nucleico que codifica el transgen terapéutico deseado. Cuando se suministra de esta manera, la proteína preterminal 1 o la secuencia, preserva el ácido nucleico terapéutico como un episoma nuclear estable y previene así la pérdida del ácido nucleico terapéutico y evita la disminución tardía en la expresión de proteína terapéutica.

Agentes biológicos

[0082] Una variedad de agentes biológicos, que incluyen tanto agentes terapéuticos como cosmecéuticos 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 y la susceptibilidad del paciente al régimen de tratamiento.

[0083] Los agentes terapéuticos adecuados que se pueden unir a una estructura negativamente cargada se pueden encontrar en esencialmente cualquier clase de agentes, que incluyen, por ejemplo, agentes analgésicos,

agentes antiasmáticos, antibióticos, agentes antidepresivos, agentes antidiabéticos, agentes anti-fúngicos, antieméticos, antihipertensivos, agentes anti-impotencia, agentes anti-inflamatorios, agentes anti-neoplásicos, agentes anti-VIH, agentes antivirales, agentes ansiolíticos, agentes para contracepción, agentes para la fertilidad, agentes anti-trombóticos, agentes protrombóticos, hormonas, vacunas, agentes inmunosupresores, vitaminas y similares. Alternativamente, los grupos negativamente cargados suficientes se pueden introducir en el agente terapéutico para lograr el complejo iónico con las estructuras positivamente cargadas descritas anteriormente. Muchos métodos adecuados tales como la fosforilación o la sulfatación existen y serán fácilmente evidentes por aquellos expertos en la técnica.

[0084] Además, ciertos agentes mismos poseen porciones adecuadas cargadas negativamente para asociar con el vehículo cargado positivamente descrito anteriormente y que no requieran la unión a una estructura negativamente cargada. En estos casos, la sustancia o un derivado de ésta tiene suficiente carga negativa para asociarse con los vehículos positivamente cargados 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 la espectrofotometría funcional versus los componentes solos.

[0085] Los agentes cosmecéuticos adecuados incluyen, por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico (EGF), así como también hormona de crecimiento humano, antioxidantes, y toxina botulinum. En el contexto de esta invención, el término "toxina botulinum" incluye no solamente los serotipos botulinum A, B, C, D, E, F, y G, sino también los fragmentos de éstos que tienen actividad de cadena ligera de botulinum.

[0086] Más particularmente, los agentes terapéuticos útiles en la presente invención incluyen tales analgésicos como la lidocaína, novocaína, bupivacaína, procaína, tetracaína, benzocaína, cocaína, mepivacaína, etidocaína, proparacaína, ropivacaína, prilocaína y similares, agentes antiasmáticos tales como azelastina, zetotifen, traxanox, corticosteroides, cromolina, nedocromil, albuterol, bitolterol mesilato, pirbuterol, salmeterol, terbutilina, teofilina y similares, agentes antibióticos tales como neomicina, estreptomicina, cloramfenicol, norfloxacin, ciprofloxacina, trimetoprima, sulfametiloazol, los antibióticos β -lactam, tetraciclina, y similares; agentes antidepresivos tales como nefopam, oxipertina, imipramina, tresadona y similares; agentes anti-diabéticos tales como biguanidina, sulfonilureas, y similares; antieméticos y antisicóticos tales como cloropromacina, flufenacina, perfenacina, proclorperacina, prometacina, tietylperacina, triflupromacina, haloperidol, escopolamina, difenidol, trimetobenzamida, y similares; agentes neuromusculares tales como atracurium mivacurium, rocuronium, succinilcolina, doxacurium, tubocurarina, y toxina de botulinum (BTX); agentes anti-fúngicos tales como amfotericina B, nistatina, candicidina, itraconazol, zetoconazol, miconazol, clotrimazol, fluconazol, ciclopirox, econazol, naftifina, terbinafina, griseofulvina, ciclopirox y similares; agentes antihipertensivos tales como propanolol, propafenona, oxiprenolol, nifedipina, reserpina y similares, agentes anti-impotencia tales como donadores de óxido nítrico y similares; agentes anti-inflamatorios que incluyen agentes anti-inflamatorios esteroides tales como cortisona, hidrocortisona, dehesame zona, prednisolona, prednisona, fluazacort, y similares, así como también agentes anti-inflamatorios no esteroides tales como indometacina, ibuprofeno, ramifenisona, piroxicam y similares; agentes antineoplásticos tales como adriamicina, ciclofosfamida, actinomicina, bleomicina, duanorubicina, dosorubicina, epirubicina, mitomicina, rapamicina, metotresato,

fluorouracilo, carboplatina, carmustina (BCNU), cisplatina, etopósido, interferones, fenesterina, tasol (que incluye análogos y derivados), camptotecina y derivados de ésta, vinblastina, vincristina y similares, agentes anti-VIH (por ejemplo, antiproteolíticos); agentes antivirales tales como amantadina, metisazona, idosuridina, citarabina, aciclovir, famciclovir, ganciclovir, foscarnet, sorivudina, trifluridina, valaciclovir, cidofovir, didanocina, estavudina, salcitabina, sidovudina, ribavirina, rimantadina y similares; agentes ansiolíticos tales como dantroleno, diazepam y similares, inhibidores de COX-2, agentes para contracepción tales como progestógeno y similares; agentes anti-trombóticos tales como inhibidores GPIIb/IIIa, activadores de plasminógeno de tejido, estreptoquinasa, uroquinasa, heparina y similares, agentes protrombóticos tales como trombina, factores V, VII, VIII y similares; hormonas tales como insulina, hormona de crecimiento, prolactina, EGF (factor de crecimiento epidérmico) y similares; agentes inmunosupresores tales como ciclosporina, asatioprina, misorobina, FK506, prednisona y similares; agentes angiogénicos tales como VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular); vitaminas tales como A, D, E, K, y similares; y otros agentes terapéutica o medicinalmente activos Ver, por ejemplo, GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, Ninth Ed Hardman, et al., eds McGraw-Hill, (1996)

[0087] En la mayoría de las modalidades preferidas, los agentes biológicos se seleccionan de insulina, toxina botulinum, VEGF, antígenos para inmunización, y agentes anti-fúngicos.

[0088] Como se anotó anteriormente para los agentes blanco y los agentes de imágenes, ciertos agentes biológicos o cosmeceúticos se pueden utilizar en la ausencia de una estructura cargada negativamente. Tales agentes biológicos o

cosméticos son aquellos que generalmente llevan una carga negativa neta en el pH fisiológico para retener el complejo con el vehículo cargado positivamente. Ejemplos incluyen toxina de botulinum (una proteína PM grande), insulina (una proteína PM pequeña), antígenos para inmunización, que pueden variar desde muy pequeño a muy grande y típicamente incluyen proteínas o glicoproteínas, y muchos agentes anti-fúngicos. En estos casos, la sustancia o un derivado de ésta tiene una carga suficientemente negativa para asociarse con los vehículos positivamente cargados 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 en el tamaño de la partícula o espectrofotometría funcional versus los componentes solos.

Estructuras negativamente cargadas que tienen porciones de imágenes unidas, que apuntan a agentes blanco o agentes terapéuticos

[0089] Para tres de los anteriores grupos de componentes, que incluyen las porciones de imágenes, los agentes blanco y los agentes terapéuticos, los compuestos individuales se pueden unir a una estructura negativamente cargada, covalentemente modificada para introducir porciones negativamente cargadas, o empleadas directamente si el compuesto contiene suficientes porciones negativamente cargadas para conferir una unión iónica a la estructura positivamente cargada descrita anteriormente. Cuando es necesario, típicamente, la unión 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 en 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), y Koneko, et al., Bioconjugate Chem 2:133-141 (1991).

[0090] En algunas modalidades, el diagnóstico terapéutico o los agentes blanco no tendrán un grupo funcional disponible para unirse al grupo de enlace, y se pueden primero modificar para incorporar, por ejemplo, un sustituyente hidroxilo, amino, o tiol. Preferiblemente, el sustituyente se suministra en una porción no interfiriente del agente, y se puede utilizar para unirse a un grupo de enlace, y no se afectará adversamente la función del agente.

[0091] En aún otro aspecto, la presente invención suministra composiciones que comprenden un complejo no covalente de una estructura positivamente cargada que tiene al menos un grupo de eficiencia unido y al menos un miembro de ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste de ARN, ADN, ribosimas, ácidos oligonucleicos modificados y cADN que codifica un transgen seleccionado. En este aspecto de la invención, la estructura positivamente cargada puede ser esencialmente cualquiera estructuras positivamente cargadas descritas anteriormente, y también comprenderán (como con las estructuras anteriores seleccionadas) al menos un grupo de eficiencia unido. Los grupos de eficiencia adecuados incluyen, por ejemplo, $(\text{Gly})_{n1}-(\text{Arg})_{n2}$ en donde el subíndice $n1$ es un entero de 3 a 5, y el subíndice $n2$ es independientemente un número impar desde 7 hasta 17 o dominios TAT. Adicionalmente, los ácidos nucleicos útiles en este aspecto de la invención son los mismos que se han descrito anteriormente.

Suministro transdérmico de insulina y ciertas moléculas mayores

[0092] Se ha encontrado que los vehículos positivamente cargados anteriores se pueden utilizar para el suministro transdérmico de insulina y otros ciertos agentes biológicamente activos que no alteran terapéuticamente los niveles de glucosa de la sangre, tal como proteínas que tienen un peso molecular de aproximadamente 50,000 y más, por ejemplo, la toxina de botulinum (BTX), o para otros agentes biológicamente activos tales como el agente basado en ácido nucleico terapéutico, un agente terapéutico sin proteína sin ácido nucleico tal como ciertos agentes anti-fúngicos o alternativamente un agente para inmunización. El uso del vehículo positivamente cargado posibilita la transmisión de la proteína o del gen marcador tanto hacia dentro como hacia fuera de las células de piel, y el suministro de este en una cantidad efectiva y una forma activa a un tejido subyacente. Por ejemplo, la insulina se puede suministrar a través de la piel hacia los capilares subyacentes para transportar a través del cuerpo sin la necesidad de inyección. La toxina de botulinum se puede suministrar a los músculos subyacentes o a las estructuras glandulares sin la piel en una cantidad efectiva para producir parálisis, producir relajación, aliviar las contracciones, evitar o aliviar los espasmos, reducir el rendimiento glandular o suministrar otros efectos deseados. El suministro local de esta manera podría lograr reducciones de dosificación, reducir la toxicidad y permitir una optimización de dosis más precisa para los efectos deseados con relación a los materiales inyectables o implantables, particularmente en el caso de la toxina de botulinum. Esta modalidad puede incluir una cantidad de anión polivalente preferiblemente pequeña, por ejemplo, fosfato, aspartato, o citrato, o se puede llevar a cabo en ausencia sustancial de tal polianión. En todos los aspectos de la presente invención, la asociación entre el vehículo y el agente biológicamente activo es una interacción no covalente, que puede incluir, por ejemplo, interacciones iónicas, unión de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, o combinaciones de éstos

[0093] El término "toxina de botulinum" como se utiliza aquí pretende referirse a cualquiera de los serotipos conocidos de la toxina de botulinum, sea producido por bacteria o por técnicas recombinantes, así como también cualquiera de tales tipos que puedan ser posteriormente descubiertos incluyendo variaciones por ingeniería o proteínas de fusión. Como se mencionó anteriormente, en el momento presente, siete neurotoxinas de Botulinum inmunológicamente distintas se han caracterizado, a saber los serotipos de neurotoxina de botulinum A, B, C, D, E, F y G, cada una de las cuales se distingue por la neutralización con los anticuerpos específicos de tipo. Los serotipos de toxina de botulinum están disponibles de Sigma-Aldrich y de Metabologics, Inc. (Madison, Wisconsin), así como también de otras fuentes. Los diferentes serotipos de toxina de botulinum varía en las especies animales que ellos afectan y en la severidad y la duración de la parálisis que ellos evocan. Al menos dos tipos de toxina de botulinum, tipos A y B, están habitualmente disponibles comercialmente en formulaciones para tratamientos de ciertas condiciones. El tipo A, por ejemplo, esta contenido en preparaciones de Allergan que tiene la marca BOTOX® y de Ipsen que tiene la marca DYSPORT®, y el tipo B esta contenido en preparaciones de Elan que tiene la marca MYOBLOC®.

[0094] La toxina de botulinum utilizada en las composiciones de esta invención puede ser un derivado de toxina de botulinum, esto es, un compuesto que tiene la actividad de la toxina de botulinum pero que contiene una o más alteraciones químicas o funcionales sobre cualquier parte o sobre cualquier cadena relativa a la ocurrencia natural o a las toxinas de botulinum nativas recombinantes. Por ejemplo, la toxina de botulinum puede ser una neurotoxina modificada, esto es una neurotoxina que tiene al menos uno de sus amino ácidos

suprimido, modificado o reemplazado, comparado con el nativo, o la neurotoxina modificada puede ser una neurotoxina producida recombinantemente o un derivado o fragmento de ésta. Por ejemplo, la toxina de botulinum puede ser una que ha sido modificada de una manera tal que, por ejemplo, mejora sus propiedades o disminuye los efectos colaterales indeseables, pero en la que permanece aún la actividad de toxina de botulinum deseada. La toxina de botulinum puede ser cualquiera de los complejos de toxina de botulinum producido por la bacteria, como se describió anteriormente. Alternativamente, la toxina de botulinum puede ser una toxina preparada utilizando técnicas químicas recombinantes o sintéticas, por ejemplo, un péptido recombinante, una proteína de fusión, o una neurotoxina híbrida, por ejemplo preparada de subunidades o dominios de diferentes serotipos de toxina de botulinum (ver la patente U.S. 6, 444,209, por ejemplo). La toxina de botulinum también puede ser una porción de la molécula total que se ha mostrado que posee la actividad de toxina de botulinum necesaria, y en tal caso se puede utilizar per se o como parte de una combinación o molécula de complejo, por ejemplo, una proteína de fusión. Alternativamente, una porción de la toxina se puede utilizar directamente con las estructuras positivamente cargadas descritas aquí con o sin las porciones blanco en razón a que la estructura positivamente cargada permite la internalización celular aún en la ausencia de la unión de BTX nativo, el blanco o los dominios de internalización. Alternativamente, la toxina de botulinum puede estar en la forma de un precursor de toxina de botulinum, que puede ser en si misma no tóxico, por ejemplo una proteasa de zinc no tóxica que se vuelve tóxica sobre cleavage proteolítico.

[0095] Esta invención también contempla el uso general de combinaciones y mezclas de toxinas de botulinum, aunque debido a su naturaleza y propiedades

diferentes, las mezclas de los serotipos de toxina de botulinum no se administran generalmente en este momento.

[0096] Similarmente, el término "insulina" incluye insulina extraída de fuentes naturales, así como también insulina que puede ser obtenida sintéticamente, por vía de medios químicos o recombinantes. La insulina también puede estar en una forma modificada, o en la forma de, por ejemplo un péptido recombinante, una proteína de fusión, o una molécula de híbrido, o la insulina en un caso particular puede ser una porción de la molécula de insulina que posee la actividad necesaria. La misma es cierta de otras proteínas que se puede utilizar en estas composiciones y métodos transdérmicos particulares, particularmente antígenos para inmunización, que pueden variar ampliamente en propiedades fisicoquímicas. De manera similar los agentes terapéuticos sin proteína sin ácido nucleico, que incluyen agentes anti-fúngicos, se pueden obtener de fuentes naturales o se pueden sintetizar.

[0097] Las composiciones de esta invención están preferiblemente en la forma de productos para ser aplicados a la piel o el epitelio de sujetos o pacientes, es decir, humanos u otros mamíferos necesitados del tratamiento particular. El término "necesitados" significa incluir tanto necesidades farmacéuticas como relacionadas con salud así como también necesidades que tienden a ser más cosmecéuticas, estéticas, o subjetivas. Las composiciones de toxina de botulinum también se pueden utilizar, por ejemplo, para alterar o mejorar la apariencia de tejido facial.

[0098] A través del uso de los vehículos positivamente cargados de esta invención, la toxina de botulinum se puede administrar transdérmicamente a un

sujeto para tratar condiciones tales como músculo facial indeseable u otros espasmos musculares, hiperhidrosis, acné, o cualquier condición en el cuerpo en la cual el alivio del dolor muscular o espasmo se desee. La toxina de botulinum se administra tópicamente para el suministro transdérmico a los músculos o a otras estructuras asociadas a la piel. La administración puede ser hecha, por ejemplo, a las piernas, hombros, espalda incluyendo baja espalda, axila, palmas, pies, cuello, pelvis, dorso de las manos o pies, rodillas, brazos superiores, tobillos, piernas superiores, nalgas, torso, pelvis, o cualquier otra parte del cuerpo donde la administración de la toxina de botulinum se desee

[0099] La administración de la toxina de botulinum también se puede llevar a cabo para tratar otras condiciones, que incluyen tratar el dolor neurológico, la prevención o reducción del dolor de cabeza por migraña u otro dolor de cabeza, la prevención o reducción del acné, la prevención o reducción de la distonía o de contracciones distónicas sean subjetivas o clínicas, la prevención o reducción de síntomas asociados con la hiperhidrosis subjetiva o clínica, reducir la hipersecreción o sudoración, reduciendo o mejorando la respuesta inmune, o el tratamiento de otras condiciones para las cuales la administración de toxina de botulinum mediante inyección ha sido sugerida o desarrollada. La administración de toxina de botulinum, otras proteínas terapéuticas que no tienen un efecto terapéutico sobre los niveles de glucosa de la sangre, otros antígenos útiles para la inmunización descrita aquí, u otros agentes terapéuticos sin ácido nucleico y sin proteína por ejemplo, la toxina de botulinum en complejo, también se pueden llevar a cabo para los propósitos relacionados con la inmunización. Alternativamente, el complejo se puede preparar al aplicar tópicamente para mejorar una respuesta inmune, por ejemplo, para suministrar la inmunización con respecto a varias proteínas, por ejemplo, para las inmunizaciones para la niñez sin

las inyecciones o la inmunización contra varios riesgos ambientales. Sorprendentemente, la administración de toxina de botulinum u otras proteínas terapéuticas, descritas aquí se pueden llevar a cabo para reducir las respuestas inmunes. La presente invención le permite al BTX y a otra proteína ser suministradas mediante una ruta alterada de administración y cambios de la presentación del antígeno complejo del agente y así puede ser útil para reducir la respuesta inmune a los antígenos a aquella proteína, y así facilitar la administración repetida sin la reducción relacionada inmune en la actividad

[0100] En general, las composiciones son preparadas al mezclar la insulina, la toxina de botulinum, u otro agente biológicamente activo tal como por ejemplo, una proteína terapéutica que no altera terapéuticamente los niveles de glucosa de la sangre, un agente basado en ácido nucleico terapéutico, un agente terapéutico sin proteína sin ácido nucleico o alternativamente un agente para inmunización para ser administrado con el vehículo positivamente cargado, y usualmente con uno o más vehículos o excipientes adicionales farmacéuticamente aceptables. En su forma más simple ellos pueden contener un vehículo o diluyente simple acuoso farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, que puede ser amortiguada. Sin embargo, las composiciones pueden contener otros ingredientes típicos en las composiciones farmacéuticas o cosmeceúticas, esto es, un vehículo dermatológica o farmacéuticamente aceptable, un vehículo o medio, es decir, un vehículo, vehículo o medio que es compatible con los tejidos a los cuales ellos se aplicarán. El término "dermatológica o farmacéuticamente aceptable", como se utiliza aquí, significa que las composiciones o componentes de éstos así descritos son adecuadas para uso en contacto con estos tejidos o para uso en pacientes en general sin toxicidad indebida, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica, y similares. Según sea apropiado, las composiciones de la invención pueden

comprender cualquier ingrediente convencionalmente utilizado en los campos bajo consideración, y particularmente en cosmeceúticos y dermatología. En todos los aspectos de la presente invención, el asocio entre el vehículo y el agente biológicamente activo es mediante interacción no covalente, que puede incluir, por ejemplo, interacciones iónicas, uniones de hidrógeno, fuerzas van der Waals, o combinaciones de éstos.

[0101] Las composiciones pueden ser pre-formuladas o pueden ser preparadas en el momento de la administración, por ejemplo, al suministrar un kit para montaje en o antes del momento de la administración. Alternativamente, como se mencionó anteriormente, la toxina de botulinum u otra proteína terapéutica y la estructura o vehículo positivamente cargado se pueden administrar en forma separada al paciente, por ejemplo, al suministrar un kit que contiene un parche para la piel u otro dispositivo de suministro que contiene la proteína terapéutica y un líquido, gel, crema o similar que contiene el vehículo positivamente cargado (y opcionalmente otros ingredientes). En aquella modalidad particular la combinación se administra al aplicar el líquido u otra composición que contiene el vehículo a la piel, seguido por la aplicación del parche de la piel u otro dispositivo.

[0102] Las composiciones de la invención son aplicadas con el fin de administrar una cantidad efectiva de la insulina, la toxina de botulinum, u otra sustancia benéfica. Para el suministro transdérmico el término "cantidad efectiva" se refiere a cualquier composición o método que suministra mayor suministro transdérmico del agente biológicamente activo relacionado con el agente en ausencia del vehículo. Para la toxina de botulinum, el término "cantidad efectiva" como se utiliza aquí significa una cantidad de toxina de botulinum como se definió

anteriormente que sea suficiente para producir la parálisis muscular deseada u otro efecto, pero que implícitamente sea una cantidad segura, es decir, una que es suficientemente baja para evitar serios efectos colaterales. Los efectos deseados incluyen la relajación de ciertos músculos con el objeto de, por ejemplo, disminuir la apariencia de líneas finas y/o arrugas, especialmente en la cara, o ajustar la apariencia facial de otras formas tal como ampliando los ojos, levantando las corneas de la boca, o suavizando las líneas que afloran del labio superior, o en general aliviar la tensión muscular. El último efecto mencionado, el alivio general de la tensión muscular, se puede lograr en la cara o en cualquier otra parte, por ejemplo, en la espalda o las piernas. Para la insulina, el término "cantidad efectiva" significa similarmente una cantidad de insulina que es suficiente para producir el efecto deseado, a saber disminución de la glucosa en el paciente o la sangre del sujeto. Para los antígenos, "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad suficiente para permitir al sujeto montar una respuesta inmune al antígeno después de la aplicación de una serie de aplicaciones del antígeno. Para los agentes anti-fúngicos, "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad suficiente para reducir los síntomas o signos de la infección fúngica. Para otros agentes biológicamente activos que no alteran terapéuticamente los niveles de glucosa de la sangre, "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad suficiente para ejercer el efecto biológico o terapéutico definido caracterizado por aquel agente en por ejemplo, Physicians' Desk Reference o similar sin inducir toxicidad significativa. La invención específicamente excluye los fragmentos de anticuerpo que no tienen actividad biológica diferente de solamente unir el antígeno específico cuando el término "terapéutico" o "proteína biológicamente activa" se emplea. En razón a que los antígenos adecuados para la inmunización tienen otras actividades biológicas tal como montar una respuesta inmune, estos permanecen incluidos en los aspectos apropiados de esta invención, sin embargo. Más aún, los agentes que

tienen una actividad biológica o un efecto terapéutico al unir un antígeno específico, bloquea de esta manera la unión del ligando o alterando la conformación del antígeno están incluidos en esta invención.

[0103] Las composiciones pueden contener una cantidad efectiva apropiada de la insulina, la toxina de botulinum, u otro agente biológicamente activo tal como, por ejemplo, una proteína terapéutica que altera terapéuticamente los niveles de glucosa en la sangre, un agente basado en ácido nucleico terapéutico, un agente terapéutico sin proteína, sin ácido nucleico o alternativamente un agente para inmunización, para aplicación como un tratamiento de dosis simple, o puede ser más concentrado, por dilución en un sitio de administración o para uso en aplicaciones múltiples. En general, las composiciones que contienen toxina de botulinum u otro agente biológicamente activo tal como, por ejemplo, una proteína terapéutica que no altera terapéuticamente los niveles de glucosa en la sangre o un agente terapéutico basado en ácido nucleico contendrá desde aproximadamente 1×10^{-20} a aproximadamente 25% en peso del agente biológicamente activo y desde 1×10^{-19} hasta aproximadamente 30% en peso del vehículo positivamente cargado. En general, las composiciones que contienen un agente terapéutico sin proteína sin ácido nucleico o alternativamente un agente para la inmunización contendrán desde aproximadamente 1×10^{-10} a aproximadamente 49.9% en peso del antígeno y desde aproximadamente 1×10^{-9} a aproximadamente 50% en peso del vehículo positivamente cargado. En general, en una forma adecuada para la aplicación al sujeto, la composición de la invención contendrá desde aproximadamente 0.001 a aproximadamente 10,000 preferiblemente desde aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1,000 IU/g de una composición que comprende toxina de botulinum y una molécula de vehículo positivamente cargada como se describe aquí La proporción de vehículo: toxina

botulinum preferiblemente varia desde aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1.01:1 y más preferiblemente desde aproximadamente 6:1 a aproximadamente 1.5:1 respectivamente. La cantidad de la molécula de vehículo o la proporción de ésta a la toxina de botulinum dependerá de cual vehículo se escoge para uso en la composición en cuestión. La cantidad apropiada o proporción de molécula de vehículo en un caso dado se puede fácilmente determinar, por ejemplo, al conducir uno o más experimentos tales como aquellos descritos adelante.

[0104] Las composiciones de esta invención permiten el suministro de una toxina de botulinum más pura con farmacocinéticas potencialmente mejoradas de actividad específica mayor. Además, el vehículo positivamente cargado reduce la necesidad de proteínas accesorias extrañas (por ejemplo, cero albúmina humana que varia desde 400-600 mg o cero albúmina recombinante que varia desde 250-500 mg) y estabilizadores de polisacárido y se pueden lograr reducciones benéficas en respuestas inmunes al BTX. Además, las composiciones son adecuadas para el uso en ambientes fisiológicos con pH que varia desde 4.5 a 6.3, y pueden tener así tal pH. Las composiciones pueden ser almacenadas preferiblemente a temperatura ambiente o refrigeradas.

[0105] Las composiciones o dispositivos que contienen toxina de botulinum generalmente se aplicarán con el fin de suministrar la toxina de botulinum en una dosis de desde aproximadamente 1U a aproximadamente 20,000U, preferiblemente desde aproximadamente 1U a aproximadamente 10,000U, de toxina de botulinum por cm² de piel, por aplicación. Las dosis mayores con estos rangos podrían ser preferiblemente empleados en conjunto con materiales de liberación controlada, por ejemplo, o permitírseles un tiempo de residencia más corto sobre la piel antes de la remoción.

[0106] En el caso de la insulina, las composiciones de la invención contendrán desde aproximadamente 0.011U a aproximadamente 5000U, preferiblemente desde aproximadamente 0.1U a aproximadamente 500U/gramo. Una composición que comprende una forma de insulina y una molécula de vehículo positivamente cargada como se describió aquí preferiblemente varía desde aproximadamente 30:1 a aproximadamente 1:01.1 y más preferiblemente desde aproximadamente 6:1 a aproximadamente 1.25:1 de vehículo de insulina, respectivamente. De manera similar, la cantidad de molécula de vehículo o la proporción de ésta a la insulina, dependerá de que vehículo es escogido para uso en la composición en cuestión.

[0107] En términos de su forma, las composiciones de esta invención pueden incluir soluciones, emulsiones (que incluyen micro emulsiones), suspensiones, cremas, lociones, geles, polvos u otro sólido típico o composiciones líquidas utilizadas para la aplicación a la piel y otros tejidos donde las composiciones se pueden utilizar. Tales composiciones pueden contener, además de la toxina de botulinum, insulina u otro agente biológicamente activo, y la molécula de vehículo, otros ingredientes típicamente utilizados en tales productos, tales como anti-microbianos, humectantes y agentes de hidratación, agentes penetrantes, preservativos, emulsificantes, aceites naturales o sintéticos, solventes, tensoactivos, detergentes, agentes gelantes, emolientes, antioxidantes, fragancias, llenadores, espesantes, ceras, absorbentes de olor, sustancias de tinte, agentes colorantes, polvos, agentes de control de viscosidad y agua, y opcionalmente incluye anestésicos, activos anti-picazón, extractos botánicos, agentes condicionantes, agentes oscurecedores o aclaradores, abrillantadores, humectantes, mica, minerales, poli fenoles, siliconas o derivados de éstos,

bloqueadores de sol, vitaminas, y fitomedicinales. En todos los aspectos de la presente invención, la asociación entre el vehículo y el agente biológicamente activo es mediante interacción no covalente, que puede incluir, por ejemplo, interacciones iónicas, uniones de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, o combinaciones de éstos.

[0108] Las composiciones de acuerdo con la invención pueden estar en la forma de composiciones de liberación controlada o liberación sostenida, en donde la insulina, la toxina de botulinum, u otra sustancia a ser suministrada y el vehículo están encapsulados o contenidos de otra forma dentro de un material de tal forma que ellos sean liberados sobre la piel de una manera controlada durante el tiempo. La sustancia a ser suministrada y el vehículo pueden estar contenidos dentro de matrices, liposomas, vesículas, micro cápsulas, micro esferas y similares, o dentro de un material particulado sólido, todo lo cual se selecciona y/o construye para suministrar liberación de la sustancia o sustancias durante el tiempo. La sustancia terapéutica y el vehículo se pueden encapsular juntos (por ejemplo, en la misma cápsula) o separadamente (en cápsulas separadas).

[0109] La administración de las composiciones de esta invención a un sujeto es, por supuesto, otro aspecto de la invención. En el caso de la toxina botulinum, más preferiblemente las composiciones son administradas mediante o bajo la dirección de un médico u otro profesional de la salud. Ellos se pueden administrar en un tratamiento simple o en una serie de tratamientos periódicos durante el tiempo. Para el suministro transdérmico de la toxina de botulinum para los propósitos mencionados anteriormente, una composición como se describió anteriormente se aplica tópicamente a la piel en un sitio o sitios donde se desee el efecto. En razón de su naturaleza, más preferiblemente la cantidad de toxina de

botulinum aplicada se debe aplicar con cuidado, en una proporción de aplicación y frecuencia de aplicación que producirá el resultado deseado sin producir ningún resultado adverso o no deseado

[0110] En el caso de la insulina, para pacientes hospitalizados o tratamientos en oficina, la administración será llevada a cabo mediante o bajo la dirección de un profesional de cuidado de la salud, pero de otra manera es probable que sea desarrollado por el paciente. La administración por parches de piel y similares, con liberación controlada y/o monitoreo es probablemente que sea un método común, de tal forma que las composiciones que contienen insulina de esta invención serán a menudo suministradas como contenidas en parches para la piel u otros dispositivos. En el caso de antígenos adecuados para inmunizaciones, más preferiblemente las composiciones son administradas mediante o bajo la dirección de un médico u otro profesional de la salud. Ellos se pueden administrar en un tratamiento simple o en una serie de tratamientos periódicos durante el tiempo. De acuerdo con esto, las composiciones de liberación sostenida también se contemplan por esta invención. Para el suministro transdérmico de los antígenos adecuados para las 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 que circunda la piel. En el caso de terapéuticos sin proteína sin ácido nucleico tal como agentes anti-fúngicos, preferiblemente las composiciones se administran bajo la dirección de un médico u otro profesional de la salud. Ellos se pueden administrar en un tratamiento simple o en una serie de tratamientos periódicos durante el tiempo. Las composiciones de liberación sostenida también se contemplan para terapéuticos sin proteína y sin ácido nucleico. Los agentes anti-fúngicos se pueden administrar a la uña del dedo o a la placa de la uña del dedo del pie o que circunda las estructuras anatómicas

utilizando, por ejemplo, una placa de uña de prótesis, una laca, una uña pulida con un agente de color, un gel, o una combinación de cualquiera de todos estos. Para el suministro transdérmico de la toxina de botulinum para los propósitos mencionados anteriormente, una composición como se describió anteriormente se aplica tópicamente a la piel.

[0111] Los kit para administrar las composiciones de la invención, bajo la dirección de un profesional del cuidado de la salud o por un paciente o sujeto, también se puede incluir un aplicador adecuado de costumbre para ese propósito. El término "aplicador de costumbre" significa incluir los medios justos mencionados para administrar los agentes anti-fúngicos.

[0112] En otro aspecto, la invención se relaciona con los métodos para la administración tópica de la combinación del vehículo positivamente cargado descrito anteriormente con una cantidad efectiva de insulina, toxina de botulinum, antígenos adecuados para inmunización, agentes anti-fúngicos u otro agente biológicamente activo tal como por ejemplo, una proteína terapéutica que no altera terapéuticamente los niveles de glucosa de la sangre, un agente basado en ácido nucleico terapéutico, o un agente terapéutico sin proteína sin ácido nucleico, en general. Como se describió anteriormente, la administración se puede efectuar mediante el uso de una composición de acuerdo con la invención que contenga los tipos apropiados y cantidades de estas dos sustancias específicamente el vehículo y el 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 o biológicamente activa se puede incorporar en forma seca en un parche de piel u otro dispositivo de suministro, y el vehículo positivamente cargado se puede

aplicar a la superficie de la piel antes de la aplicación del parche de tal forma que los dos actúen juntos, resultando en el suministro transdérmico deseado. En ese sentido, así, las dos sustancias, específicamente el vehículo y el agente biológicamente activo, actúan en combinación o en conjunto, o quizás interactúan para formar una composición o combinación in situ.

Métodos para preparar las composiciones

[0113] En otro aspecto, la presente invención suministra un método para preparar una composición farmacéutica, el método comprende combinar un componente de estructura positivamente cargado y al menos dos miembros seleccionados del grupo que consiste de:

i) una primera estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de porciones de imágenes unidas, o alternativamente una pluralidad de porciones de imágenes cargadas negativamente;

ii) una segunda estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes blanco unidos, o alternativamente una pluralidad de porciones blanco cargadas negativamente;

iii) Al menos un miembro seleccionado de ARN, ADN, ribosomas, ácidos oligonucleicos modificados y cADN que codifica un transgen seleccionado,

iv) ADN que codifica al menos un factor de persistencia; y

v) una tercera estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes biológicos unidos, o un agente biológico negativamente cargado;

con un vehículo farmacéuticamente aceptable para formar un complejo no covalente que tiene una carga positiva neta, con la condición de que al menos uno de los miembros se seleccione de i), ii), iii) o v).

[0114] En un aspecto relacionado, como se describió aquí, algunas modalidades o composiciones de esta invención, la estructura positivamente cargada o el vehículo se pueden utilizar solos para proporcionar suministro transdérmico de ciertos tipos de sustancias. Aquí se prefiere las composiciones y métodos que comprendan un agente biológicamente activo tal como la toxina de botulinum u otra proteína terapéutica que no disminuya la glucosa de la sangre que contiene desde aproximadamente 1×10^{-20} a aproximadamente 25% en peso del agente biológicamente activo y desde 1×10^{-19} hasta aproximadamente 30% en peso del vehículo positivamente cargado. También se prefieren las composiciones y métodos que comprenden un terapéutico sin ácido nucleico sin proteína tal como un agente anti-fúngico o un antígeno adecuado para inmunización que contiene desde 1×10^{-10} a aproximadamente 49.9% en peso del antígeno y desde aproximadamente 1×10^{-9} a aproximadamente 50% en peso del vehículo positivamente cargado. En todos los aspectos de la presente invención, la asociación entre el vehículo y el agente biológicamente activo es mediante interacción no covalente, que puede incluir, por ejemplo, interacciones iónicas, unión de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, o combinaciones de éstos.

[0115] La amplia aplicabilidad de la presente invención se ilustra por la facilidad con la cual una variedad de composiciones farmacéuticas se puede

formular. Típicamente, las composiciones se preparan al mezclar el componente de estructura positivamente cargado con los componentes deseados de interés (por ejemplo, ADN, blancos, imágenes o componentes terapéuticos) en proporciones y una secuencia para obtener las composiciones que tengan una carga positiva neta variable. En muchas modalidades, las composiciones se pueden preparar, por ejemplo, al lado del lecho utilizando vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables para la administración de la composición. Alternativamente, las composiciones se pueden preparar al mezclar adecuadamente los componentes y luego liofilizarlos y almacenarlos (típicamente a temperatura ambiente o por debajo) hasta que se utilice o formule en un vehículo adecuado de suministro.

[0116] Las composiciones se pueden formular para suministrar mezclas adecuadas para administración tópica, cutánea, oral, rectal, vaginal, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraocular, transdérmica, etc. 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 la membrana de mucosa). Ellas pueden ser en particular soluciones estériles, isotónicas o composiciones secas, en particular composiciones secadas por congelamiento, las cuales, por adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o de solución fisiológica salina, permiten a las soluciones inyectables ser hechas. Por ejemplo, las dosis de ácido nucleico utilizado para la inyección y el número de administraciones se pueden adaptar de acuerdo con varios parámetros, y en particular de acuerdo al modo de administración utilizado, la patología de preocupación, el gen a ser expresado, o alternativamente la duración deseada del tratamiento.

[0117] Alternativamente, cuando las composiciones van a ser aplicadas tópicamente, por ejemplo, cuando se desea un suministro transdérmico, el componente o componentes de interés se puede aplicar en forma seca a la piel, por ejemplo, por vía de utilizar un parche de piel, donde la piel es tratada separadamente con la estructura o vehículo positivamente cargado. De esta manera la composición total es esencialmente formada *in situ* y la administración al paciente o sujeto

Métodos para utilizar las composiciones

Métodos de suministro

[0118] Las composiciones de la presente invención se pueden suministrar a un sujeto, célula o sitio blanco, bien se *in vivo* o *ex vivo* utilizando una variedad de métodos. De hecho, cualquiera de las rutas normalmente utilizadas para introducir una composición en el contacto final con el tejido a ser tratado se puede utilizar. Preferiblemente, las composiciones se administrarán con vehículos farmacéuticamente aceptables. Los métodos adecuados para administrar tales compuestos están disponibles y bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, y, aunque más de una ruta se puede utilizar para administrar una composición particular, una ruta particular puede a menudo suministrar una reacción más inmediata y más efectiva que otra ruta. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que es administrada, así como también por el método particular utilizado para administrar la composición. De acuerdo con esto, existe una amplia variedad

de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas de la presente invención (*ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed. 1985)

[0119] La administración puede ser, por ejemplo, intravenosa, tópica, intraperitoneal, subdérmica, subcutánea, transcutánea, intramuscular, oral, intra-articular, parenteral, intranasal, o mediante inhalación. Los sitios adecuados para la administración incluyen así, pero no están limitados a, la piel, los bronquios, el tracto gastrointestinal, el ojo, y el oído. Las composiciones incluyen típicamente un vehículo farmacéutico convencional o excipiente y puede adicionalmente incluir otros agentes medicinales, vehículos, adyuvantes, y similares. Preferiblemente, la formulación será de aproximadamente 5% a 75% en peso de una composición de la invención, con el resto consistente de excipientes farmacéuticos adecuados. Los excipientes apropiados se pueden ajustar a la composición particular y a la ruta de administración mediante métodos bien conocidos en la técnica (*ver, ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18TH ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)*)

[0120] Las formulaciones pueden tomar formas sólidas, semi-sólidas, polvo liofilizado, o dosis líquidas, tal como, por ejemplo, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones, emulsiones, supositorios, enemas de retención, cremas, ungüentos, lociones, geles, aerosoles, o similares. En modalidades 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, sucrosa, fosfato de di calcio, y similares, un desintegrante tal como almidón o derivado de éste, un lubricante tal como estearato de magnesio y similar, y un ligador tal como almidón, goma de acacia, polivinilpirrolidona, gelatina, celulosa y derivados de éstos. Las

composiciones se pueden presentar en una dosis unitaria o en recipientes multi-dosis sellados, tal como ampollas o frascos. Las dosis administradas a un paciente deben ser suficientes para lograr una respuesta terapéutica benéfica en el paciente durante el tiempo. La invención excluye específicamente fragmentos de anticuerpo que no tengan actividad biológica diferente a solamente unir el antígeno específico cuando el término "terapéutico" o "proteína biológicamente activa" se emplea. En razón a que los antígenos adecuados para la inmunización tienen otras actividades biológicas tales como montar una respuesta inmune, estos permanecen incluidos en los aspectos apropiados de esta invención, sin embargo. Más aún, los agentes que tienen actividad biológica o un efecto terapéutico mediante la unión de un antígeno específico, bloquean de esta manera la unión del ligando o alteran la conformación del antígeno están incluidos en esta invención.

[0121] En algunas modalidades, una formulación de liberación sostenida o de liberación controlada se puede administrar a un organismo o a células en cultivo que puedan llevar las composiciones deseadas. La composición de liberación sostenida se puede administrar al tejido de un organismo, por ejemplo, mediante inyección. Por "liberación sostenida", se significa que la composición, preferiblemente una que codifica al transgen de interés o al agente biológico o terapéutico, se hace disponible para toma por los tejidos circundantes o células en cultivo durante un periodo de tiempo mayor que el que se lograría mediante la administración de la composición en un medio menos viscoso, por ejemplo, una solución salina.

[0122] Las composiciones, solas o en combinación con otros componentes adecuados, se pueden hacer en formulaciones de aerosol (es decir, ellas se

pueden "nebulizar") para ser administradas por vía de inhalación. Las formulaciones de aerosol se pueden ubicar en unos propulsores presurizados aceptables, tales como di cloro di fluoro metano, propano, nitrógeno, y similares. Para el suministro por inhalación, las composiciones también se pueden suministrar como un polvo seco (por ejemplo, Nektar Therapeutics, San Carlos, CA).

[0123] La formulaciones adecuadas para la administración parenteral, tal como, por ejemplo, mediante rutas intravenosa, intramuscular, intradérmica, y subcutánea, incluyen soluciones de inyección acuosa y no acuosa estériles isotónicas, que pueden contener antioxidantes, motivadores, bacteriostatos, y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizadores, agentes espesantes, estabilizadores, y preservativos.

[0124] Otro método de administración incluye, pero no esta limitado a, la administración que utiliza globos angioplásticos, catéteres, y formulaciones de gel. Los métodos para el suministro de globos angioplásticos, catéter y formulación de gel son bien conocidos en la técnica.

Métodos de imágenes

[0125] Un experto en la técnica entenderá que las composiciones de la presente invención pueden ser ajustadas para una variedad de usos de imágenes. En una modalidad, la colonoscopia virtual se puede desarrollar utilizando un sistema basado en componente para imágenes. Actualmente, la colonoscopia virtual involucra esencialmente infundir contraste en un colon y suavizar las imágenes sobre CT, luego reconstruyendo una imagen 3-D. Técnicas similares se

podían emplear para MR. Sin embargo, las eses, las mucosidades, y el aire sirven todos como barrera de contraste y pueden dar una superficie artificial a la reconstrucción de la pared del colon. Además de un contraste con objetivo celular ayudaría solucionar estas barreras para suministrar una reconstrucción de pared real y ayudar a evitar tanto los positivos falsos como los negativos falsos. Existen varias maneras de que el sistema basado en componente pudiera ser aplicado aquí. Más simplemente, la estructura de eficiencia catiónica se podría aplicar con un agente de contraste simple, por ejemplo, CT, MR, u óptico. Así, la capa de superficie celular se podía visualizar y cualquiera irregularidades u obstrucciones detalladas en la reconstrucción de la imagen. Sin embargo, el sistema basado en componente ofrece la opción adicional de agregar un segundo agente específico. Este agente podía consistir de una estructura de eficiencia catiónica, una porción de imagen diferente, y componentes blanco, por ejemplo, un blanco de dos características de antígeno de cáncer de colon. Las porciones de imágenes del simple al diagnóstico se podrían seleccionar de tal forma que uno fuera el contraste CT y el otro el contraste MR, y para que ambos fueran contraste MR siendo uno un agente T2 y el otro un agente T1. De esta manera, la superficie se podría reconstruir como anteriormente, y cualquier región específica para el antígeno de tumor se podría visualizar y sobre poner sobre la reconstrucción original. Adicionalmente, los agentes terapéuticos se podrían incorporar en el sistema de diagnóstico blanco también. Estrategias similares se podrían aplicar a enteritis regional y a colitis ulcerativa (y de nuevo combinada con terapia). Alternativamente, las porciones de imagen óptica y los métodos de detección se podrían emplear, por ejemplo, en el caso de diagnóstico de melanoma o el manejo, preferiblemente en conjunto con porciones de imágenes fluorescentes. El agente de imagen óptico se puede seleccionar por ejemplo del grupo que incluye

Cy3, Cy3.5, Cy5 5, Cy7, Cy7.5, Oregon green 488, Oregon green 500, Oregon green 514, Green fluorescent protein, 6-FAM, Texas Red, Hex, TET, y HAMRA

EJEMPLOS

Ejemplo 1

[0126] Este ejemplo ilustra una composición adecuada para el suministro transdérmico de complejos muy grandes, a saber un plásmido que contiene el transgen de proteína fluorescente azul (BFP), utilizando un estructura positivamente cargada o un vehículo de la invención.

Selección de Estructura

[0127] La estructura positivamente cargada se ensambló aludir covalentemente Gly₃Arg₇ a polilisina PM 150 000 por vía de carboxilo de la glicina Terminal a las aminas libres de las cadenas laterales de lisina a un grado de saturación de 18% (es decir 18 de cada 100 residuos de lisina son covalentemente unidos a un Gly₃Arg₇) La estructura modificada se designó "KNR2" para denotar un segundo tamaño del vehículo peptídico. En el policación de control fue polilisina no modificada (designada "K2", Sigma Chemical Co., San Louis, MO) del mismo tamaño del mismo lote. Un policación de control adicional, Superfect® (Qiagen) que es un agente basado en dendrímero activado, se seleccionó como una referencia par proporciones de transfección in Vitro alta (es decir control positivo simultaneo y referencia para eficiencia del estado de la técnica versus toxicidad in Vitro).

Selección de Agente Terapéutico:

[0128] Como un plasmado de 8 kilobase (pSport-base template, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) que contiene transgen entero para la proteína fluorescente (BFP) y las secuencias de flanqueo parciales manejadas por el promotor citomegalovirus (CMV) fue empleado. El BFP sirve como un marcador identificable para las células que han sido transfectadas, luego transcritas y traducidas al gen y pueden ser directamente visualizadas (es decir sin tñido adicional) bajo microscopia fluorescente. Así, solamente las células en las cuales el complejo ha cruzado tanto la membrana del plasma como la membrana nuclear antes de que el suministro de carga neta pueda tener la expresión del transgen. Este plasmado 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 éstos complejos.

Preparación de las muestras:

[0129] En cada caso, un exceso de polición se empleo para ensamblar un complejo final que tiene un exceso de carga positiva. Aunque incrementando la densidad de carga se incrementa el tamaño (es decir más estructuras presentes por complejo), el incremento en la densidad en el factor de eficiencia para complejos puede descentrar estos cambios. Así, puede ocurrir un óptimo a bajas proporciones (es decir basados en tamaño) o altas proporciones (es decir densidad de factor basado en eficiencia) y ambos son evaluados aquí para KNR2. Las proporciones óptimas para la eficiencia k2 y la eficiencia Superfect fueron seleccionadas con base a recomendaciones de fabricantes y antes de los reportes sobre la eficiencia máxima. Las dosis terapéuticas de acido

nucleico se estandarizaron a través de todos los grupos y fue el volumen total y el pH final de la composición a ser evaluada en el cultivo de la célula.

[0130] Las siguientes mezclas se prepararon.

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

Protocolos de Cultivo de Célula

[0131] Todos los experimentos de cultivo se desarrollaron por observadores ciegos a la identidad de los grupos de tratamiento. Sobre las placas de 6 pozos, 1.0 mL de cada solución se agregó a unas células de músculo liso aórtico humano primario HA-VSMC confluentes 70% (pasage 21; ATCC, Rockville, MD) y crecidas en M-199 con 10% de suero durante 48 horas a 37° Celsius y 10% de CO₂. Los

pozos de control no tratados fueron evaluados así como también cada grupo fue evaluado en pozos n=5 por grupo.

Análisis de Eficiencia

[0132] Las fotografías de baja amplificación (total 10X) de placas de célula intactas fueron obtenidas por observadores ciegos a 60 grados, 180 grados y 200 grados de la parte superior de cada pozo utilizando un microscopio de epi-fluorescencia Nikon E600 con un filtro BFP y lentes apocromat plan. Las imágenes Pro Plus Image análisis suite (media Cybernetes, Silver Spring, MD) se empleó para determinar el porcentaje de área de célula total que fue positiva. Este resultado se normalizó al área de célula total para cada uno y se reportó como eficiencia del gen suministrado (porcentaje de las células totales que expresan en transgen en niveles detectables).

Análisis de la toxicidad

[0133] Los pozos fueron posteriormente evaluados por observadores ciegos en un ensayo de exclusión de tinte (células viables excluyen tinte, mediante las no viables no pueden), seguido por la solubilización en 0.4% SDS en solución salina amortiguada de fosfato. Las muestras fueron evaluadas en un espectómetro 5 UV/VIS Spectronic Genesys a una longitud de onda a 595 nm (azul) para evaluar cuantitativamente las células no viables como una medición directa de la toxicidad del agente de transfección. Las muestras se estandarizaron con los números de células idénticos para ajustar las concentraciones para aparear los valores OD280 antes de las mediciones de OD 595.

Manejo de Datos y Análisis Estadístico

[0134] El teñido positivo total se determinó por un observador ciego por vía de un análisis de imagen utilizando Software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) y normalizada así la selección total del área para determinar el porcentaje el teñido del positivo porcentual para cada uno. La media y el error estándar fueron posteriormente determinados para cada uno de los grupos con análisis de significancia del 95 % confianza en una vía ANOVA mediciones repetidas utilizando Statview software (Abacus, Berkeley, CA)

Resultados:

Eficiencia

Los resultados de las eficiencias son 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%

Procedimientos # 4 y # 5 exhiben significancia estadística ($P < 0.05$ mediante las mediciones repetidas ANOVA de un factor con ensayo Fisher PLSD y TUKEY-A posthoc)

Toxicidad

[0135] Los datos de toxicidad media son como sigue (reportados en AU a OD595, valores bajos tales como los presentes con solución salina sola se correlacionan con la baja toxicidad, aunque mayores valores tales como los precedentes en la condición 1 indican una toxicidad celular mayor)

Solución salina -0.057 A;

1) 3.460 A,

2) 0.251 A;

3) 0.291 A;

4) 0.243 A,

5) 0.297 A;

6) 0.337 A.

Conclusiones:

[0136] Un suministro en menos tóxico más eficiente se puede lograr por una proporción de 1.25 a 4.0 de KNR2 a ADN que controla aún aquellos del Superfect estándar dorado habitual. Este experimento confirma la capacidad de suministrar complejos terapéuticos muy grandes a través de membranas que utilizan este vehículo.

EJEMPLO 2

[0137] Este ejemplo ilustra el transporte de ácido nucleico grande a través de la piel por un vehículo en la invención después de una administración simple.

Selección de la Estructura

[0138] La estructura positivamente cargada se ensambló mediante unión covalente Gly_3Arg_7 a la polilisina con PM de 250.000 por vía de carboxil de la glicina terminal a las aminas libres del lado de la glicina a un grado de saturación del 18% (es decir 18 de cada 100 residuos de lisina es covalentemente unido a un Gly_3Arg_7). La estructura modificada se designó "KNR2" como anteriormente. El policonrol de control fue una polilisina no modificada (designada "K2", Sigma Chemical Co., MO del mismo tamaño y del mismo lote. El policonrol de control adicional, Superfect (Qiagen) que es un agente basado en dendrímer activado, se seleccionó como una referencia para las proporciones de transfección altas (es decir control positivo simultáneo y referencia al estado del arte versus la toxicidad in Vitro)

Selección de agentes terapéuticos

[0139] Para el presente experimento, un plásmido de 8.5 kilobase (pSport – based template, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) que contienen en transgen completo para E. coli beta –galactosidasa (βgal) y las secuencias de flaqueo parcial manejadas por un citomegalovirus (CMV) promotor se empleó. Aquí el βgal sirve como un marcador identificable para las células que han sido transfectadas, luego transcriben y traducen el gen y pueden ser directamente visualizadas y después de tinte específico bajo la enzima extraña. Así, solamente las células en las cuales el complejo ha cruzado la piel cuando alcanza la célula objeto y translocada a través tanto de la membrana del plasma como de la membrana nuclear antes de que el suministro de carga alta pueda tener expresión de transgen. Este plásmido particular tiene un peso molecular de aproximadamente 2 805.000

Preparación de las muestras

[0140] En cada caso, un exceso de polimerización se emplea para ensamblar un complejo final que tenga un exceso carga positiva. Las proporciones óptimas para la eficiencia de K2, KNR2 y antes de los experimentos in Vitro para determinar la eficiencia máxima. La dosis terapéutica de ácido nucleico estandarizada a través de todos los grupos fue el volumen total y el pH final de la composición a ser aplicada tópicamente. Los ejemplos fueron de la siguiente manera:

Grupo marcado AK1: 8 microgramos de plásmido β gal (p/CMV-sport- β gal) por alícuota final (es decir 80 miligramos total) y vehículo peptidilo KNR2 a una proporción de carga de 4:1 se mezclaron hasta homogeneidad y se diluyeron a 200 microlitros con solución salina amortiguada de fosfato. La composición de resultantes se mezcló hasta homogeneidad con 1.8 ml de humectador Cetaphil con alícuota en porciones de 200 microlitros para experimentos in vivo

Grupo marcado AL1: 8 miligramos de plásmido β gal (p/CMV-sport- β gal) por alícuota final (es decir 80 microgramos total) y K2 a una proporción de carga de 4:1 se mezclaron hasta homogeneidad y se diluyeron a 200 microlitros con solución salina amortiguada de fosfato. La composición resultante se mezcló hasta homogeneidad con 1.8 ml de Cetaphil y con alícuotas en porciones de 200 microlitros para experimentos in vivo.

Grupo marcado AM1: 8 microgramos de plásmido β gal (p/CMV-sport- β gal) por alícuota final (es decir 80 microgramos total) y Superfect a una

proporción de carga de 5:1 se mezcló hasta homogeneidad y se diluyó a 200 microlitros con solución salina amortiguada de fosfato. La composición resultante se mezcló hasta homogeneidad con 1.8 ml de Cetaphil y con alícuotas en porciones de 200 microlitros para experimentos in vivo.

Experimentos Animales para determinar las eficiencias de suministro transdérmica después de un tratamiento simple con vehículos peptídico y terapéuticos de ácido nucleico

[0141] Los animales fueron anestesiados por vía de inhalación de isoflurano durante la aplicación de tratamientos. Después de ser anestesiados, 6 ratones C57 negros (n=4 por grupo) habían medido dosis de 200 microlitros del tratamiento apropiado aplicado a la porción craneana de la piel trasera dorsal (seleccionada porque el ratón no puede alcanzar esta región con la boca o los miembros). Los animales no sufrieron tratamiento depilatorio. Los animales se recuperaron en un ambiente de calor controlado para evitar la hipotermia y una vez respondieron se les suministró alimento y agua ad libitum durante toda la noche. Veinticuatro horas postratamiento, los ratones fueron sometidos a eutanasia por vía de inhalación de CO₂, y los segmentos de piel tratada fueron cosechados con grosor completo por observadores ciegos. Los segmentos tratados se dividieron en tres porciones iguales la porción craneana se fijó en 10% de formalina amortiguada neutra durante 12-16 horas luego se almacenó en 70% de etanol hasta que se embebió en parafina. La porción central fue congelada de manera instantánea y empleada directamente para tinción con beta-galactosidasa a 37 grados Celsius sobre 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 Trombosis in an in vivo Rabbit Model Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 95(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 fue congelado de manera instantánea para estudios de solubilización.

Toxicidad

[0142] La toxicidad se evaluó mediante exclusión de tinte sobre secciones pareadas a aquellas analizadas para la eficiencia anterior. Las secciones solamente sufrieron teñido para eficiencia o para toxicidad en una zona en que los métodos no son confiablemente coempleados. Para los análisis de toxicidad, las secciones fueron inmersas en un tinte de exclusión durante 5 minutos, luego encubados a 37 grados Celsius durante 30 minutos con 10% de CO₂. Cualquiera de las células que no excluye el tinte en este periodo fue considerada no viable.

Manejo de datos y análisis estadístico

[0143] La colección de datos y el análisis de imágenes se desarrollaron por observadores ciegos. Las secciones teñidas como anteriormente fueron fotografiadas en su totalidad sobre un microscopio Nikon E600 con lentes plan-apochromat. Las imágenes resultantes sufrieron procesamiento de análisis de imagen de tanta utilizando un software Image Pro Plus como anteriormente con la confirmación manual para determinar el número positivo de actividad de enzima beta-galactosidasa (azul fue el método se sustrato empleado aquí) o toxicidad

celular. Estos resultados fueron normalizados a un número concepción cruzada total de células mediante un teñido rojo rápido nuclear para cada uno y tabulado como un teñido positivo en sección cruzada porcentual. Posteriormente, el error medio y estándar se determinó posteriormente para cada grupo con análisis de significancia al 95% de confianza en unas medidas repetidas con ANOVA de una vía utilizando un software Statview (Abacus, Berkeley, CA).

Resultados

[0144] Los resultados se resumen en la tabla de adelante y se ilustran en la figura 3. El vehículo de suministro transdérmico peptidilo cargado positivamente logró incrementos estadísticamente significativos en la eficiencia de suministro y la expresión del transgen versus tanto K2 (control esencialmente negativo) y el "benchmark" estándar para eficiencia, Superfect. Mientras el Superfect logró mejoras estadísticamente significativas sobre K2, el KNR2 tenía más de un orden de magnitud de mejora en la eficiencia de suministro versus superfect en este sistema de modelo

Ejemplo 2: El error medio y estándar para células positivas beta-galactosidasa como porcentaje del número total de grupo de tratamiento.

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

P=0.0001 (Significativo al 99%)

[0145] Los resultados para toxicidad están presentes en la figura 4, que describen porcentaje del área total que permaneció no viable 24 horas post

tratamiento. Aquí, K2 exhibe toxicidad celular estadísticamente significativa con relación al KMR2 o Superfect, aun a una dosis donde K2 tiene una baja eficiencia de transferencia como se describió previamente (Amabile, P.G., J.M. Waugh, T. Lewis, C.J. Elkins, T. Janus, M.D. Juo, and M.D. Dake. Intravascular Ultrasound Enhances in vivo Vascular Gene Delivery. J.Am Col.Cardio..2001 June; 37(7): 1975-80)

Conclusión

[0146] El vehículo transdérmico peptídico puede transportar complejos grandes a través de la piel con altas eficiencias, particularmente dados constreñimientos de la expresión de transgen y el tamaño de complejo total discutido previamente. El área positiva aquí, en lugar del número positivo se empleo para análisis en razón a que (1) el método es grandemente simplificado y tiene mayor precisión en análisis de imagen, (2) las demostraciones de punto de eficiencia ya se habían logrado en II.B conclusivamente, (3) las mediciones de área suministraron un alcance más amplio para el entendimiento de resultado in vivo en razón a que los componentes no celulares ocupan una porción substancial de la sección transversal, y (4) la comparación a complejos de vehículo no peptídico aun mayores se facilitó

Ejemplo 3

[0147] Este ejemplo ilustra el suministro transdérmico de un terapéutico basado en ácido nucleico grande a través de la piel utilizando un vehículo de peptídico positivamente cargado de la invención en siete aplicaciones secuenciales diarias.

Selección de estructura.

[0148] La estructura de peptidilo cargada positivamente se ensambló al unir covalentemente $\text{--Gly}_3\text{ARg}_7$ a polilisina PM 150, 000 por vía de carboxilo de la glicina terminal a las aminas libres de las cadenas laterales de glicina a un grado de saturación del 18% (es decir 18 de cada 100 residuos de glicina están covalentemente unidos a un $\text{--Gly}_3\text{Arg}_7$). La estructura modificada se designo "KNR2". El policación de control fue una poliglicina no modificada (designada "K", Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) del mismo tamaño y el mismo lote.

Selección de agente terapéutico

[0149] Para el presente experimento, un plásmido de 8.5 kilobase (pSport-based template, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) que contiene el transgen entero para beta-galactosidasa de E. Coli (βgal) y secuencias de flanqueo parcial manejadas por un promotor de citomegalovirus (CMV) se empleó. Este plásmido particular tiene un peso molecular de aproximadamente 2, 805, 000 y se seleccionó así para evaluar el suministro de terapéuticos muy grandes a través de la piel por vía de los vehículos peptidilo

Preparación de muestras

[0150] En cada caso, se empleó un exceso de policación para ensamblar un complejo final que tiene un exceso de carga positiva. Las proporciones experimentales se seleccionaron para ser paralela a los experimentos de dosis simple presentados en el experimento previo. La dosis terapéutica de ácido

nucleico se estandarizo a través de todos los grupos como fue el volumen total y el pH final de la composición a ser aplicada tópicamente. Las mezclas se prepararon como sigue:

Grupo marcado AK1: 8 microgramos de plásmido β gal (p/CMV-sport- β gal) por alícuota final (es decir 240 miligramos total) y vehículo peptidilo KNR2 a una proporción de carga de 4:1 se mezclaron hasta homogeneidad y se diluyeron a 600 microlitos con solución salina amortiguada de fosfato. Las composiciones de resultantes se mezclaron hasta homogeneidad con 5.4 ml de Cetaphil y se hicieron alícuotas en porciones de 200 microlitros para experimentos in vivo.

Grupo marcado AL1: 8 miligramos de plásmido β gal (p/CMV-sport- β gal) por alícuota final (es decir 240 microgramos total) y K2 a una proporción de carga de 4:1 se mezclaron hasta homogeneidad y se diluyeron a 600 microlitros con solución salina amortiguada de fosfato. La composición resultante se mezcló hasta homogeneidad con 5.4 ml de Cetaphil y se hicieron alícuotas con porciones de 200 microlitros para experimentos in vivo.

Experimentos animales para determinar las eficiencias de suministro transdérmicas acumuladas después de siete tratamientos de una vez al día con vehículos peptidilo y terapéuticos de ácido nucleico

[0151] Los animales fueron anestesiados por vía de inhalación de isoflurane durante la aplicación de los tratamientos. Después de ser anestesiados, 6 ratones negros C57 (n=4 por grupo) habían medidos dosis de 200 microlitros del

tratamiento apropiado aplicado a la porción craneana de la piel de la espalda dorsal (seleccionada porque el ratón no puede alcanzar esta región con su boca o miembro). Los animales no sufrieron tratamiento depilatorio. Los animales se recubrieron en un ambiente de calor controlado para evitar la hipotermia y una vez respondieron se les suministró alimento y agua ad libitum durante toda la noche. Este procedimiento se repitió una vez diariamente a aproximadamente el mismo tiempo durante 7 días. Después de 7 días de tratamiento, los ratones fueron sometidos a eutanasia por vía de inhalación de CO₂, y los segmentos de piel tratados fueron cosechados a grosor completo por observadores ciegos. Los segmentos tratados fueron divididos en tres porciones iguales: la porción craneana se fijó en formalina amortiguada neutra al 10% durante 12-16 horas y luego almacenada en 70% de etanol hasta que se embebió en parafina. La porción central fue secada instantáneamente y empleada directamente para tñida con beta-galactosidasa a 37 grados Celsius sobre las secciones previamente descritas. El segmento de caudal tratado fue secado instantáneamente para estudios de solubilización.

Manejo de datos y análisis estadístico

[0152] La recolección de datos y el análisis de imagen se desarrollaron por observadores ciegos. Las secciones teñidas como anteriormente fueron fotografiadas en su totalidad sobre un microscopio Nikon E600 con lentes plan-apochromat. Las imágenes resultantes sufrieron procesamiento de análisis de imagen de tñida utilizando un software Image Pro Plus como se hizo antes con la confirmación manual para determinar el área positiva para la actividad de enzima de beta-galactosidasa. Estos resultados fueron normalizados a un área de sección transversal total para cada una y tabulada como teñido positivo en sección

transversal porcentual Posteriormente, el error medio y estándar se determino posteriormente para cada grupo con análisis de significancia en 95% de confianza en medidas repetidas con ANOVA de una vía utilizando un software Statview (Abacus, Berkeley, CA)

Resultados

[0153] Los resultados se resumen en la tabla de adelante y se ilustran en la figura 5. El vehículo de suministro transdérmico de peptidilo logro incrementos estadísticamente significativos en la eficiencia de suministro y en la expresión de transgen versus K2.

Ejemplo 3. Error medio y estándar para expresión de transgen acumulado de beta galactosidasa como porcentaje del area total después de 7 días de aplicación una vez al día de cada grupo de tratamiento.

Grupo	Media	Error Estándar
AK	5.004	2.120
AL	0.250	0 060

P=0.0012 (significativo al 99%)

Ejemplo 4 (vehículo no peptidilo)

[0154] este ejemplo ilustra el suministro transdérmico de un terapéutico basado en un ácido nucleico grande atrvez de la piel, utilizando un vehículo no peptidilo positivamente cargado de la invención en siete aplicaciones secuenciales diarias.

Selección de estructura:

[0155] la estructura cargada positivamente se ensambló al unirse covalentemente-Gly₃Arg₇ a polietilenoimina (PEI) PM 1,000 000 vía carboxilo de la glicina terminal a las aminas libres de las cadenas laterales PEI a un grado de saturación del 30% (es decir 30 de cada 100 residuos de lisina están covalentemente unidos a un – Gly₃Arg₇). La estructura modificada se designó "PIR" para denotar el vehículo no peptídico grande. El polímero de control fue un PEI no modificado "designado "PEI", Sigma Chemical Co., ST, Louis, MO) del mismo tamaño y del mismo lote.

Selección de agente terapéutico:

[0156] Para el presente experimento un plásmido de 8 5 Kilobase (pSport-based template, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) que contenía el transgén completo para beta-galactosidasa de E. Coli (β gal) y secuencias de flanqueo parcial manejadas por un promotor de citomegalovirus (CMV) se empleó. El plásmido particular tiene un peso molecular de aproximadamente 2,805 000.

Preparación de las muestras.

[0157] En cada caso, un exceso de polímero se empleó para ensamblar un complejo final que tiene un exceso de carga positiva. La dosis terapéutica de ácido nucleico se estandarizó a través de todos los grupos como lo fue el volumen total y el pH final de la composición a ser aplicado tópicamente. Las muestras se prepararon como sigue.

Grupo barcado AS: 8 microgramos de plásmido de β gal (p/CMV-sport- β gal) por alícuota final (es decir 240 microgramos total) y el PEI de control a una proporción de carga de 5:1 se mezcló hasta homogeneidad y se diluyó a 600 microlitros con un amortiguador Tris-EDTA. La composición resultante se mezcló hasta homogeneidad con 5.4 ml de cetafil y alícuotas en porciones de 200 microlitros para experimentos en vivo.

El grupo marcado AT: 8 microgramos de plásmido de β gal (p/CMV-sport- β gal) por alícuota final (es decir 240 microgramos total) y un vehículo no peptídico compuesto PEIR ("PEIR") a una proporción de carga de 5:1 se mezclaron hasta homogeneidad y se diluyeron a 600 microlitros con amortiguador Tris-EDTA. La composición resultante se mezcló hasta homogeneidad con 5.4 ml de Cetafil y se partió en alícuotas con porciones de 200 microlitros para experimentos en vivo.

Grupo marcado AU: 8 microgramos de plásmido de β gal (p/CMV-sport- β gal) por alícuota final (es decir 240 microgramos total) y un vehículo no peptídico Essentia purificado PEIR ("PEIR puro") a una proporción de carga de 5:1 se mezcló hasta homogeneidad y se diluyó hasta 600 microlitros con Tris-EDTA-amortiguador. La composición resultante se mezcló hasta homogeneidad con 5.4 ml de Cetafil y se partió en alícuotas de porciones de porciones de 200 microlitros para experimentos en vivo.

Experimentos animales para determinar las eficiencias del suministro transdérmico acumulado después de 7 tratamientos de aplicación una vez al día con vehículos no peptídicos y terapéuticos de ácido nucleico

[0158] los animales fueron anestesiados por vía de inhalación de isoflurano durante la aplicación de los tratamientos. Después de ser anestesiados 6 ratones negros C57 (n=3 por grupo) se habían medido dosis de 200 microlitros de el tratamiento apropiado aplicado a la porción craneana de la piel de la espalda dorsal (seleccionada por que el ratón no puede alcanzar este régimen con la boca o los miembros). Los animales no sufrieron tratamiento depilatorio. Los animales fueron recuperados en un ambiente de calor controlado para evitar la hipotermia y una vez respondieron se les suministro alimento y agua ad libitum durante toda la noche. Este procedimiento se repitió una vez al día aproximadamente al mismo tiempo del día durante 7 días. Después de 7 días de tratamiento, los ratones eran sometidos a eutanasia por vía de inhalación de CO₂, y los segmentos de piel tratados fueron cosechados en grosor completo por observadores ciegos los segmentos tratados se dividieron en 3 porciones iguales de la porción craneana en formalina amortiguada neutra 10% durante 12-16 horas luego se almaceno en etanol al 70% hasta que se embebió en parafina la porción central fue secada de manera instantanea y empleada directamente para tñido con β -galactosidasa a 37° Celsius sobre secciones previamente descritas. El segmento de caudal tratado fue secado instantáneamente para estudios de solubilizacion.

Manejo de datos y análisis estadístico:

[0159] La recolección de datos y el análisis de imagen se desarrollo por observadores ciegos las secciones tñidas tal como anteriormente se fotografiaron en su totalidad sobre un microscopio Nikon E600 con lentes plan-apochromat. Las imágenes resultantes sufrieron procesamiento de análisis de imagen de tanta utilizando un software Image Pro Plus con confirmación manual para determinar el área positiva para la actividad de la encima β -galactosidasa. Estos resultados

fueron normalizados hasta área de sección transversal total para cada uno y tabulados como teñido positivo de sección transversal porcentual. Posteriormente, se determino posteriormente la medida estándar para cada grupo con análisis de significancia al 95% de confianza en medidas repetidas de ANOVA de una vía utilizando el software Statview (Abacus, Berkeley, CA).

Resultados:

[0160] Los resultados se resumen en la tabla de adelante y se ilustran en la figura 6. El vehículo de suministro transdérmico no peptídico en ambas una forma de compuesto y una forma ultrapura-logro incrementos estadísticamente significativos para la eficiencia del suministro y la expresión de transgen versus PEI. La forma ultrapura de PEIR exhibió que la tendencia hacia las eficiencias mayores del PIR estándar son consistentes con la actividad específica calculada mayor del reactivo

Ejemplo 4 la media y el error estándar para expresión de transgen acumulado de β -galactosidasa como porcentaje del área total después de 7 aplicaciones de una vez al día 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=0.0058 (significativo al 99%)

Conclusiones

[0161] El vehículo transdérmico no peptídico puede transportar grandes complejos a través de la piel con altas eficiencias como particularmente dados los

constreñimientos de la expresión del transgen y el tamaño de complejo total discutido previamente. Aunque las eficiencias no son tan grandes como aquellas obtenidas con los complejos mas pequeños del vehículo de peptidilo), se lograron ganancias significativas. Denotar, la distribución de la expresión del transgen utilizando los complejos de peptidilo grandes fue casi exclusivamente basado en el folículo piloso, aunque los resultados para los vehículos de peptidilo fueron difundidos totalmente en las secciones transversales. Así, el tamaño y el tropismo de la estructura se pueden emplear para un nuevo blanco nano- mecánico de suministro.

Ejemplo 5

[0162] Este experimento demuestra el uso de un vehículo peptidilo para transportar un complejo grande que contiene una proteína marcada intacta de toxina de botulinum a través de la piel intacta después de una administración de una vez con relación a los controles

Selección de la estructura:

[0163] La estructura positivamente cargada se ensambló mediante unión covalente-Gly3Arg7 a polilisina PM 112,000 por vía de carboxilo de la glicina terminal a las aminas libres de las cadenas laterales de glicina a un grado de saturación de 18% (es decir 18 de cada 100 residuos de glicina son covalentemente unidos a un -Gly3Arg7) La estructura modificada se designó "KNR". El policatión de control fue una polilisina no modificada (designada "K", Sigma Chemical Co , St Louis, MO) del mismo tamaño y del mismo lote

Agente terapéutico:

[0164] La marca Botox® de la toxina botulinum A (Allergan) se selecciono para este experimento. Esta tenía un peso molecular de aproximadamente 150.000.

Preparación de las muestras:

[0165] la toxina de botulinum se reconstituyo de acuerdo con las instrucciones del fabricante Una alícuota de la proteína se biotinilo con un exceso molar calculado de 12 veces de sulfa-NHS-LC botina (Pierce Chemical). El producto marcado se designo "Btox-b".

[0166] En cada caso, se empleo un exceso de policación para ensamblar un complejo final que tiene un exceso de carga positiva como en el suministro de complejos de ácido nucleico grandes altamente negativos. Una carga neutra o positiva neta evita la repulsión de los complejos de proteína de los policationes de superficie altamente negativa y de la matriz extracelular. La dosis de Btox-b se estandarizo a través de todos los grupos, como lo fue el volumen total y el pH final de la composición para ser aplicada tópicamente. Las muestras se prepararon como sigue:

Grupo marcado "JMW-7". 2.0 unidades de Btox-b por alícuota (es decir 20 U total) y un vehículo peptidilo KNR a una proporción de PM calculada de 4:1 se mezcló hasta homogeneidad y se diluyó hasta 200 microlitros con solución salina amortiguada de fosfato. La composición resultante se mezcló hasta homogeneidad con 1.8 ml de Cetafil y se dividió en alícuotas con porciones de 200 microlitros

Grupo marcado "JMW-8" 2.0 unidades de Btox-b por alícuota (es decir 200 U total) y K a una proporción de carga de 4:1 se mezclaron hasta homogeneidad y se diluyeron a 200 microlitros con solución salina amortiguada de fosfato. La composición resultante se mezcló hasta homogeneidad con 1.8 ml de Cetafil y con alícuotas en porciones de 200 microlitros.

Los experimentos animales para determinar las eficiencias del suministro transdérmico después de un tratamiento de tiempo simple con vehículos de peptidilo y con toxina de Botulinum marcada:

[0167] Los animales fueron anestesiados por vía de inhalación de isoflurano durante la aplicación de los tratamientos. Después de ser anestesiados, 6 ratones negros, C57 (n=4 por grupo) sufrieron afectación tópica de una dosis de 200 mililitros medida del tratamiento de aplicación aplicado a la porción craneana de la piel de la piel de la espalda dorsal (seleccionada por que el ratón no puede alcanzar esta región con la boca o los miembros). Los animales no sufrieron depilación a los 7 minutos después del tratamiento inicial, los ratones fueron sometidos a eutanasia por vía de inhalación de CO₂ y los segmentos de piel tratada fueron cosechados a grosor total por observadores ciegos. Los segmentos tratados fueron divididos en tres porciones iguales; la porción craneana se fijó en 10% de formalina amortiguada neutra durante 12-16 horas luego se almacenó en 70% de etanol hasta que se embebió en parafina. La porción de control fue secada de manera instantánea y empleada directamente para visualización de biotina por observadores ciegos como se resume adelante. El segmento de caudal tratado se congeló de manera instantánea para estudios de estabilización.

[0168] La visualización de Biotina se condujo como sigue En resumen, cada sección se sumergió durante 1 hora en solución de amortiguador NeutrAvidin® Para visualizar la actividad de la fosfatasa alcalina las secciones transversales fueron lavadas con solución salina cuatro veces y luego sumergidas en NBT/BCIP (Pierce Scientific) durante 1 hora. Las secciones fueron entonces enjugadas en solución salina y fotografiadas en su totalidad en un microscopio Nikon E600 con lentes plan-apochromat.

Manejo de datos y análisis estadísticos

[0169] El teñido positivo total se determino por un observador ciego por vía de un análisis de imagen de tanda utilizando un software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) y se normalizo hasta un área de sección transversal total para determinar el teñido positivo porcentual para cada uno La media y el error estándar fueron posteriormente determinados para cada grupo con análisis de significancia del 95% de confianza en una medición repetida de ANOVA DE UNA vía utilizando un software Statview (Abacus, Berkeley, CA)

Resultados

[0170] El área de sección transversal media positiva para la toxina en biotinilada se reporto como porcentaje del área total después de la administración tópica de una vez de Btox-b con KNR ("EB-Btox") o K ("nl") Los resultados se presentan en la tabla siguiente y se ilustran en la figura 7. En la figura 7, el área positiva para marcado se determinó como porcentaje del área total después de tres días de tratamiento de una vez al día con "EB-Btox" el cual contenía Btox-b y el vehículo

peptidilo KNR y "nl", el cual contenía Btoxb con un policación K como un control.

Se describe la media y el error estándar para cada uno de los grupos.

Ejemplo 5 Media y error estándar para el área de toxina de botulin marcada como porcentaje de la sección transversal total después de la administración tópica de una vez 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 al 99%)

Ejemplo 6

[0171] El ejemplo 5 demostró que el vehículo transdérmico de peptidilo permitió una transferencia eficiente de toxina botulinum después de la administración tópica en un modelo de murino de piel intacta sin embargo este experimento no indico si la toxina de botulinum de la proteína compleja se libero de una forma funcional después de la translocación a través de la piel El siguiente experimento fue construido así para evaluar si la toxina de botulinum puede ser terapéuticamente suministrada a través de piel intacta como un agente tópico utilizando este vehículo de peptidilo (de nuevo, sin modificación covalente de la proteína).

[0172] La estructura positivamente cargada fue de nuevo ensamblada mediante unión covalente $\text{--Gly}_3\text{Arg}_7$ a polilisina PM 112 000 por vía de carboxilo de la glicina terminal hasta las salinas libres de las cadenas laterales de glicina a un grado de saturación de 18% (es decir 18 de cada 100 residuos de glicina se

unen covalentemente a un -Gly3Arg7) La estructura modificada se designo "KNR". El policación de control fue una pollisina no modificada (designada "K", Sigma Chemical Co , St. Louis, MO) del mismo tamaño y del mismo lote El mismo agente terapéutico de toxina de botulinum se utilizó en el ejemplo 5, y se preparo de la misma manera. Las muestras fueron preparadas como sigue

Grupo marcado "JMW-9": 2.0 unidades de botulinum por alícuota (es decir 60 U total) y un vehículo peptídilo KNR a una proporción de PM calculada de 4.1 se mezcló hasta homogeneidad y se diluyó hasta 600 microlitros con solución salina amortiguada de fosfato. La composición resultante se mezcló hasta homogeneidad con 5.4 ml de Cetafil y se puso en alícuotas en proporciones de 200 microlitros

Grupo marcado "JMW-10": 2 0 unidades de botulinum por alícuota (es decir 60 U total) y K a una proporción de carga de 4:1 se mezclaron hasta homogeneidad y se diluyeron hasta 200 microlitros con solución salina amortiguada de fosfato La composición resultante se mezcló hasta homogeneidad con 5 4 ml de Cetafil y se puso en alícuotas en porciones de 200 microlitros.

Grupo marcado "JMW-11": 2.0 unidades de botulinum por alícuota (es decir 60 U total) sin policación se diluyó hasta 600 microlitros con solución salina amortiguada de fosfato La composición resultante se mezcló hasta homogeneidad con 5 4 ml de Cetafil y se puso en alícuotas en porciones de 200 microlitros.

Experimentos animales para determinar la eficacia terapéutica después del tratamiento de una vez con vehículos de peptidilo y toxina de botulinum:

[0173] Los animales fueron anestesiados por vía de inhalación de isoflurano durante la aplicación de tratamientos. Después de ser anestesiados, 6 ratones negros, C57 (n=4 por grupo) sufrieron aplicación topica de dosis medidas de 400 mililitros del tratamiento apropiado aplicado uniformemente desde los dedos del pie hasta la mitad del fémur. Ambos miembros fueron tratados, y los tratamientos fueron aleatorizados a cada lado. Los animales no sufrieron depilación a los 30 minutos después del tratamiento inicial, los ratones fueron evaluados por su capacidad de abducción digital de acuerdo con las calificaciones de abducción digital publicadas para la movilidad de las patas después de la administración de toxina de botulinum (Auki, KR A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice Toxicon. 2001 Dec, 39(12): 1815-20). la movilidad del ratón también fue evaluada subjetivamente

Manejo de datos y análisis estadísticos

[0174] Las codificaciones de abducción digital fueron tabuladas independientemente por dos observadores ciegos. La media y el error estándar fueron posteriormente determinados para cada grupo con análisis de significancia al 95% de confianza en medidas repetidas en ANOVA de una vía utilizando un software Statview (Abacus, Berkeley, CA).

Resultados:

[0175] las calificaciones de abducción digital media después de administración tópica de una vez de la toxina de botulinum con KNR ("JMW-9"), K ("JMW-10") o diluyentes en policación ("JMW-11"), se presentan en la tabla de adelante y se ilustran en la fotomicrografia representativa de la figura 8. El vehículo peptídilo KNR logro un suministro funcional estadísticamente significativo de toxina de botulinum a través de la piel con relación a ambos controles que fue comparable uno con el otro. Las repeticiones independientes adicionales (total de tres experimentos independientes todos con idénticas conclusiones en parálisis estadísticamente significativa de la toxina de botulinum tópica con KNR pero no con los controles) del presente experimento confirmo los presentes hallazgos y revelo diferencias no significativas entre la toxina de botulinum tópica con y sin K (es decir ambos controles). De manera interesante, los ratones deambularon consistentemente hacia miembros paralizados (lo que ocurrió en 100% de los animales tratados y 0% de los controles de cualquier grupo de control) Como se mostró en la figura 8 los miembros tratados con toxina de botulinum mas la polilisina de policación de control o con toxina de botulinum sin policación ("Btox sola") puede movilizar los dígitos (como un mecanismo de defensa cuando se pinchan), pero los miembros tratados con toxina de botulinum mas el vehículo de botulinum KNR ("losion Essentia Btox") no podian ser movidos.

Ejemplo 6 calificaciones de abducción 30 minutos después de la aplicación topica de una vez de la toxina de botulinum con el vehículo de peptídilo KNR ("JMW-9") con un policación de controlK ("JMW-10") o solo ("JMW-11")

<u>Grupo</u>	<u>Medio</u>	<u>Error estándar</u>
<u>JMW-9</u>	<u>3.333</u>	<u>0 333</u>
<u>JMW-10</u>	<u>0.333</u>	<u>0 333</u>
<u>JMW-11</u>	<u>0 793</u>	<u>0 300</u>

P=0.0351 (significancia al 95%)

Conclusión:

[0176] este experimento sirve para demostrar que el vehículo transdérmico de peptidilo puede transportar una cantidad terapéuticamente efectiva de botulinum terapéutico a través de la piel sin modificación covalente del terapéutico. El experimento también confirma que la toxina de botulinum no funciona cuando se aplica tópicamente en controles.

Ejemplo 7

[0177] Este experimento demuestra el desempeño de un vehículo no peptidilo en la invención

Selección de la estructura:

[0178] La estructura positivamente cargada ensamblada mediante unión covalente-Gly3Arg7 a polietilenoimina (PEI) PM 1.000.000 por vía de carboxilo de la glicina terminal a las aminas libres de las cadenas laterales PEI a un grado de saturación de 30% (es decir 30 de cada 100 residuos de glicina son covalentemente unidos a un -Gly3Arg7). La estructura modificada se designó "PEIR". para denotar el vehículo no peptidilo grande el polímero de control fue un PEI no modificado (designado "PEI", Sigma Chemical Co., St Louis, MO) del mismo tamaño y del mismo lote. El mismo agente terapéutico de toxina de botulinum se utilizó como en el ejemplo 5.

[0179] La toxina de botulinum fue reconstituida del producto BOTOX® de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En cada caso, se empleo un exceso de polícatión para ensamblar el complejo final que tuvo un exceso de carga positiva como de suministro de complejos de ácido nucleico grandes altamente negativos. Una carga neutra o positiva neta evita la repulsión del complejo de proteína de los proteoglicanos de superficie celular altamente negativa y de las matrices extracelulares. La dosis de toxina de botulinum se estandarizó a través de todos los grupos como lo fue el volumen total y pH final de la composición a ser aplicada tópicamente. Las muestras fueron preparadas como sigue:

Grupo marcado "AZ": 2.0 unidades de toxina de botulinum por alícuota (es decir 60 U total) y el vehículo no peptídico PIR en forma ultra pura a una proporción de PM calculada de 5:1 se mezcló hasta homogeneidad y se diluyó a 600 microlitros con solución salina amortiguada de fosfato. La composición resultante se mezcló hasta homogeneidad con 5.4 ml de Cetafil y se hicieron alícuotas en porciones de 200 microlitros.

Grupo marcado "BA": 2.0 unidades de botulinum por alícuota (es decir 60 U total) y PI a una proporción de carga de 5:1 se mezclaron hasta homogeneidad y se diluyó a 600 microlitros con solución salina amortiguada de fosfato. La composición resultante se mezcló hasta homogeneidad con 5.4 ml de Cetafil y con alícuotas en porciones de 200 microlitros.

Experiments animales para determinar la eficacia terapéutica después del tratamiento de una de estas:

[0180] Los animales fueron anestesiados por vía de inhalación de isoflurano durante la aplicación de los tratamientos. Después de ser anestesiados, 6 ratones negros, C57 (n=3 por grupo) sufrieron aplicación tópica de dosis 400 microlitros medidas del tratamiento aproximado aplicado uniformemente desde los dedos del pies a el fémur medio. Ambos miembros fueron tratados, y los tratamientos fueron aleatorizados en cada lado. Los animales no sufrieron depilación 30 minutos después del tratamiento inicial, los ratones fueron evaluados por su capacidad de abducción digital de acuerdo con las calificaciones de abducción digital publicadas para la movilidad de las patas después de administración de toxina de 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) la movilidad del ratón también fue evaluada subjetivamente

Manejo de datos y análisis estadístico:

[0181] Las calificaciones de abducción digital fueron tabuladas independientemente por dos observadores ciegos. La media y el error estándar fueron posteriormente determinados para cada grupo con análisis de significancia al 95% de confianza en medidas repetidas de ANOVA de una vía utilizando un software Statview (Abacus, Berkeley, CA).

Resultados.

[0182] Las calificaciones de abducción digital media después de una administración tópica de la toxina de botulinum con PEIR ultra puro ("AZ"), o el polícatión de control PEI ("BA"), y repetición (repetición independiente simple para este experimento), se presentan en las tabas de adelante. El vehículo no peptidilo

PEIR logró un suministro funcional estadísticamente significativo de toxina de botulinum a través de la piel con relación a los controles. Como anteriormente, los animales se observaron caminar en círculos a través de los miembros paralizados.

Ejemplo 7. Repetición 1. Calificaciones de abducción digital 30 minutos después de la administración tópica de una vez de la toxina de Botulinum con PEIR ultra puro ("AZ") o el polícatión de control PEI ("BA"). Se presentan la media y el error estándar.

Grupo	Media	Error Estándar
BA	0.833	0.307
AZ	3.917	0.083

P=0.0002 (Significativa al 99%)

Ejemplo 7. Repetición 2. Calificaciones de abducción digital 30 minutos después de la administración tópica de una vez de la toxina de Botulinum con PEIR ultra puro ("AZ1") o el polícatión de control PEI ("BA1"). Se presentan la media y el error estándar.

Grupo	Media	Error Estándar
BA1	0.333	0.211
AZ1	3.833	0.167

P=0.0001 (Significativa al 99%)

[0183] Este experimento demostró que el vehículo transdérmico no peptídico puede transportar dosis terapéuticas de toxina de botulinum a través de la piel sin modificación covalente anterior de la toxina de botulinum. Estos hallazgos complementan aquellos con los agentes de transferencia de peptídico. La opción de utilizar un vehículo no peptídico o uno peptídico para lograr el efecto terapéutico permitirá ajustarse a las circunstancias específicas, ambientes y métodos de

aplicación y agregar el espíritu de la plataforma de suministro transdérmico de esta invención.

[0184] En estos ejemplos, la penetración de la toxina de botulinum con vehículos de peptidilo o no peptidilo versus la toxina de botulinum tópica sin el vehículo establece adicionalmente la utilidad para la penetración transdérmica de antígenos para inmunización, particularmente para la inmunización con antígenos que atraviesan la piel de manera pobre diferente tales como el botulinum. El suministro de una toxina de botulinum funcional asegura que al menos cuatro epítomos diferentes se han suministrado transdérmicamente en un estado intacto; el hecho de que la toxina de botulinum funcional no se suministra en la ausencia del vehículo en cualquier ejemplo confirma que el vehículo logra una inmunización significativa potencial con relación al agente en la ausencia del vehículo. En razón a que la inmunización requiere que el antígeno atraviese la piel en una cantidad suficiente para montar una respuesta inmune, esta aproximación permite el suministro transdérmico de un antígeno para la inmunización. En razón a que esta aproximación no requiere la modificación covalente del antígeno y no necesita involucrar transferencia de gen viral, surgen un número de ventajas en términos de seguridad estabilidad, y eficiencia

Ejemplo 8

[0185] Este experimento detalla la producción de vehículos peptidilo y no peptidilo con factores de eficiencia TAT, así como también el montaje de estos vehículos sin toxinas de botulinum.

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

[0186] El fragmento TAT GGGRKKRRQRRR (6 mg, 0.004 mmol, Sigma Genosys, Houston, TX), les falta todos los grupos protectores de cadena lateral, se disolvió en 1 ml de amortiguador MES 0.1M. A este se agregó EDC (3 mg, 0.016 mmol) seguido por peso molecular PEI 400k 50% de solución (w:v) en agua, (~0.02 ml, $\sim 2.5 \times 10^{-5}$ mmol) el pH se determinó para que fuera 7.5 por papel de ensayo. Otra porción de 1 ml de 0.1M de MES se agregó y el pH se ajustó a ~5 mediante adición de HCl. Otra porción de EDC (5 mg, 0.026 mmol) se agregó y la reacción, pH~5 se agitó durante toda la noche. La mañana siguiente, la mezcla de reacción se congeló y liofilizó.

[0187] Una columna (diámetro 1 cm x altura 14 cm) de Sefadex G-25 (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) fue puesto en suspensión estéril 1 x PBS. La columna fue estandarizada mediante elución de dextranos FITC (Sigma, St. Louis, MO) que tiene un peso molecular de 19kD. El estándar inicialmente eluido a 5 ml de PBS, tuvo un pico medio de 6 ml y una cola de 7 ml. La mezcla de reacción liofilizada de la anterior se disolvió en un PBS de volumen pequeño y se aplicó a la columna. Esta se eluyó mediante aplicaciones sucesivas de 1 ml de PBS. Las fracciones fueron recolectadas con la primera que consiste de los primeros 3 ml eluidos incluyendo el volumen de reacción. Las fracciones posteriores fueron de 1 ml.

[0188] Las fracciones eluidas fueron ensayadas para absorbancia UV a 280 nm. Las fracciones 3, 4 y 5 correspondientes a 5-7 ml definieron un pico de absorbancia modelo. Todas las fracciones fueron liofilizadas y fueron tomados los

espectros IR. Las características de pico triple de guanidina ($2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$) del fragmento TAT fueron vistas en las fracciones 4-6. Estas fracciones también mostraron una tensión de amida a 1700 cm^{-1} confirmando así el conjugado del fragmento TAT y el PEI.

[0189] Otra iteración fue conducida utilizando el fragmento TAT GGGRKKRRQRRR (11.6 mg, 0.007 mmol). Esta cantidad se calculó de tal forma que uno en 30 de aminos PEI se esperaría que reaccionara con el fragmento TAT. Esta se aproxima al factor de eficiencia de la composición de la polilisina-oligoarginina original (KNR) descrita anteriormente. La unión covalente exitosa del fragmento TAT a las aminos PEI se confirmó por IR como anteriormente.

Acoplamiento de la polilisina al fragmento TAT:

[0190] a una solución de polilisina (10 mg 1.1×10^{-4} mmol; Sigma) en 1 ml de 0.1 M de MES, pH ~4.5 se agregó fragmento TAT (4mg, 0.003 mmol) luego EDC (3.5 mg, 0.0183 mmol). La mezcla de reacción resultante (pH ~ 4.5) se agitó a TA. La reacción se congeló a -78°C durante toda la noche. Al siguiente día la mezcla de reacción se descongeló a TA y el pH se ajustó a ~ 8 mediante la adición de bicarbonato de sodio saturado. La mezcla de reacción se aplicó directamente a una columna de Sefadex G-25 constituida y estandarizada como se describió anteriormente. Esta se eluyó en siete fracciones de 1 ml partiendo después de 5 ml. La absorbancia de UV 280 se tomó, revelando un pico relativo de fracción 2,3 y 4. El IR de las fracciones liofilizadas reveló el pico de guanidina característico ($2800-3000 \text{ cm}^{-1}$) en las fracciones 1-7. La fracción 1 tuvo un pico fuerte a 1730 cm^{-1} y nada a 1600 cm^{-1} , para las fracciones 2-6 lo opuesto fue lo cierto. Así, la

unión covalente exitosa del fragmento TAT al vehículo de peptidilo, polilisina, se confirmó

[0191] El fragmento TAT covalentemente unido y el PEI (PEIT) y el fragmento TAT covalentemente unido y la polilisina (KNT) fueron posteriormente mezcladas con toxina de botulinum para formar un complejo no covalente como sigue:

Gupo marcado "JL-1": 2.0 unidades de Btox-b por alícuota (es decir 20 U total) y PEIT a una proporción de carga de 4:1 se mezclaron hasta homogenidad y se diluyeron en 200 micro litros con una solución salina amortiguada de fosfato.

Gupo marcado "JL-2": 2.0 unidades de Btox-b por alícuota (es decir 20 U total) y KNT a una proporción de carga de 4:1 se mezclaron hasta homogenidad y se diluyeron en 200 micro litros con una solución salina amortiguada de fosfato.

[0192] Después de la formación de complejo no covalente, las partículas fueron centrifugadas a 12,000 x g en una micro centrífuga rotatoria durante 5 minutos, luego resuspendidas en 20 micro litros de agua desionizada y evaporadas sobre una celda de reflectancia total atenuada con Germanio para IR. La presencia de Btox-b en el complejo fue así confirmada. En total, este experimento confirmó que los esquemas sintéticos se podían aplicar a otros factores de eficiencia y los vehículos resultantes se pueden lograr con un agente biológicamente activo – en este caso toxina de botulinum – como en los ejemplos

anteriores utilizando vehículos con grupos de ramificación o eficiencia cargados positivamente con oligoarginina.

Ejemplo 9

[0193] Este experimento demostró el desempeño del vehículo peptídico para imágenes de un antígeno específico. En este ejemplo, los complejos de uno de los vehículos de peptídico Essentia, KNR2, con porciones de imágenes ópticas y anticuerpos modificados que apuntan al melanoma son adecuados para la detección tópica del melanoma

Selección de estructura

[0194] La estructura de peptídico positivamente cargada se ensambló mediante unión covalente $\text{--Gly}_3\text{Arg}_7$ a poli lisina PM 150,000 por vía de carboxilo de la glicina terminal de las aminas libres de las cadenas laterales de lisina a un grado de saturación de 18% (es decir, de cada 100 residuos de lisina esta covalentemente unido a un $\text{--Gly}_3\text{Arg}_7$). La estructura modificada fue designada "KNR2". El poli catión de control fue poli lisina no modificada (designada "K2", Sigma Chemical Co., St Louis, MO) del mismo tamaño y del mismo lote

[0195] Un anticuerpo monoclonal de murino a un dominio de melanoma humano conservado, gangliosida 2, (IgG3, US Biologicals, Swampscott, MA) fue covalentemente unido a una cadena de anión de poli aspartato corto (PM 3,000) por vía de acoplamiento EDC como se hizo anteriormente para generar un anticuerpo derivado designado "Gang2Asp". Adicionalmente, un agente de imagen aniónico se designó utilizando un ácido oligonucleico como un poli anión en donde

la secuencia fue ATGC-J (designada "ATGC-J" en lo sucesivo) con "J" representando Texas Red fluoróforo covalentemente unido, (Sigma Genosys, Woodlands, TX) Para este experimento, 6.35 micro gramos de Gang2Asp se combinaron con 0.1712 micro gramos de ATGC-J y luego se volvieron complejos con 17.5 micro gramos de KNR2 en un volumen total de 200 micro litros de agua desionizada hasta lograr la proporción final de 5:1:1::KNR2:ATGC-J.Gang2Asp La mezcla fue sometida a vórtice durante 2 minutos. Los complejos resultantes fueron aplicados a cortes de melanoma humano CellTek hidratados y cortes de CellTek citoqueratin (SDL, Des Plaines, IL) e incubados durante 5 minutos antes de la evaluación fotográfica de distribución de fluorescencia versus distribución de campo brillante de pigmento de melanoma en el mismo campo. Los controles de adición sin ATGC-J o sin Gang2Asp también fueron empleados.

Resultados.

[0196] Los complejos no covalentes lograron una distribución del agente de imagen óptica que siguió el tropismo del derivado de anticuerpos en lugar de la distribución de los complejos en la ausencia del anticuerpo. Más notoriamente, los complejos siguieron una distribución que coincidía con la de las células de melanoma pigmentadas, como se describió en la figura 9.

Conclusiones

[0197] Este experimento demuestra la producción del complejo viable para transporte a través de la piel y visualización del melanoma a través de técnicas ópticas utilizando un vehículo adecuado para el suministro tópico Tal aproximación se puede emplear por ejemplo en conjunto con configuración de

margen quirúrgico o se puede emplear en supervisión de rutina de un melanoma. Estrategias similares se podrían emplear fácilmente para diagnóstico tópico de otros desórdenes relacionados con la piel también, como será evidente para un experto en la técnica. Dada la muy alta sensibilidad de las porciones de imagen óptica, la promesa significativa de detección mejorada de estos desórdenes se podría lograr a través de estos complejos no covalentes.

[0198] Se entiende que los ejemplos y modalidades descritos aquí son solamente con propósitos ilustrativos y que varias modificaciones o cambios a la luz de estos serán sugeridos por las personas expertas en la técnica y se deben incluir dentro del espíritu y previsión de esta aplicación y alcance de las reivindicaciones finales. Todas las publicaciones, patentes, y solicitudes de patentes citadas aquí se incorporan aquí como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

REIVINDICACIONES

- 1 Una composición que comprende una proteína biológicamente activa que no altera terapéuticamente los niveles de glucosa de la sangre y un vehículo que comprende una estructura positivamente cargada que tiene unos grupos ramificados unidos positivamente cargados y que están presentes en una cantidad efectiva para el suministro transdérmico, en donde la asociación entre el vehículo y la proteína biológicamente activa es no covalente.
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la composición suministra mayor suministro transdérmico de la proteína biológicamente activa con relación al agente en la ausencia del vehículo.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2 en la cual la proteína biológicamente activa tiene una actividad terapéutica.
4. Una composición que comprende un agente biológicamente activo sin proteína sin ácido nucleico y un vehículo que comprende una estructura positivamente cargada que tiene unos grupos ramificados unidos positivamente cargados y que esta presente en una cantidad efectiva para el suministro transdérmico, en donde la asociación entre el vehículo y el agente biológicamente activo es no covalente.
5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4 en donde la composición suministra mayor suministro transdérmico del agente biológicamente activo con relación al agente en la ausencia del vehículo

6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5 en la cual el agente biológicamente activo tiene una actividad terapéutica.
7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3 en la cual la proteína terapéutica tiene un peso molecular de al menos 50,000 kD
8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la cual la estructura comprende un poli péptido positivamente cargado.
- 9 Una composición de acuerdo con la reivindicación 8 en la cual la estructura comprende un poli péptido positivamente cargado que tiene un peso molecular de desde aproximadamente 10,000 a aproximadamente 1,500,000.
- 10 Una composición de acuerdo con la reivindicación 8 en la cual la estructura comprende un poli péptido positivamente cargado que tiene un peso molecular de desde aproximadamente 25,000 a aproximadamente 1,200,000.
11. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8 en la cual la estructura comprende un poli péptido positivamente cargado que tiene un peso molecular de desde aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,000,000
- 12 Una composición de acuerdo con la reivindicación 8 en la cual la estructura comprende una poli lisina positivamente cargada

13. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12 en la cual la estructura comprende una poli lisina positivamente cargada que tiene un peso molecular de desde aproximadamente 10,000 a aproximadamente 1,500,000
14. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12 en la cual la estructura comprende una poli lisina positivamente cargada que tiene un peso molecular de desde aproximadamente 25,000 a aproximadamente 1,200,000.
15. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12 en la cual la estructura comprende una poli lisina positivamente cargada que tiene un peso molecular de desde aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,000,000.
16. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la cual la estructura comprende un polímero no peptídico positivamente cargado
17. Una composición de acuerdo con la reivindicación 16 en la cual la estructura de polímero no peptídico comprende una poli alquileo imina positivamente cargada.
18. Una composición de acuerdo con la reivindicación 17 en la cual la poli alquileo imina es una poli etileno imina.

19. Una composición de acuerdo con la reivindicación 18 en la cual la poli etileno imina tiene un peso molecular de desde aproximadamente 10,000 a aproximadamente 2,500,000.
- 20 Una composición de acuerdo con la reivindicación 18 en la cual la poli etileno imina tiene un peso molecular de desde aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,800,000.
- 21 Una composición de acuerdo con la reivindicación 18 en la cual la poli etileno imina tiene un peso molecular de desde aproximadamente 500,000 a aproximadamente 1,400,000.
22. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la cual el vehículo comprende un polímero positivamente cargado que tiene grupos ramificados unidos positivamente cargados independientemente seleccionada de $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT y fragmentos de éstos, y Antennapedia PTD y fragmentos o mezclas de éstos, en los cuales el subíndice $n1$ es un entero de 0 a aproximadamente 20, y el subíndice $n2$ es independientemente un entero impar de desde 5 a aproximadamente 25.
23. Una composición de acuerdo con la reivindicación 22 en la cual los grupos ramificados positivamente cargados son independientemente seleccionados de los grupos que tienen la formula $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$.

24. Una composición de acuerdo con la reivindicación 23 en la cual el superíndice n_1 es un entero de desde aproximadamente 1 a aproximadamente 8.

25. Una composición de acuerdo con la reivindicación 23 en la cual el superíndice n_1 es un entero de desde aproximadamente 2 a aproximadamente 5.

26. Una composición de acuerdo con la reivindicación 23 en la cual el superíndice n_2 es un número aleatorio de desde aproximadamente 7 a aproximadamente 17

27. Una composición de acuerdo con la reivindicación 23 en la cual el superíndice n_2 es un número aleatorio de desde aproximadamente 7 a aproximadamente 13

28. Una composición de acuerdo con la reivindicación 22 en la cual los grupos ramificados se seleccionan de HIV-TAT y fragmentos de éstos.

29. Una composición de acuerdo con la reivindicación 28 en la cual los grupos ramificados unidos positivamente cargados 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

30. Una composición de acuerdo con la reivindicación 22 en la cual los grupos ramificados son grupos de Antennapedia PTD o fragmentos de éstos
31. Una composición de acuerdo con la reivindicación 22 en la cual el polímero positivamente cargado comprende un poli péptido
32. Una composición de acuerdo con la reivindicación 31 en la cual el poli péptido se selecciona de poli lisinas, poli argininas, y poli ornitinas.
- 33 Una composición de acuerdo con la reivindicación 32 en la cual el poli péptido es una poli lisina.
- 34 Una composición de acuerdo con la reivindicación 22 en la cual el polímero comprende un polímero no peptídico positivamente cargado.
35. Una composición de acuerdo con la reivindicación 34 en la cual el polímero no peptídico comprende una poli alquileno imina positivamente cargada.
36. Una composición de acuerdo con la reivindicación 35 en la cual la poli alquileno imina es una poli etileno imina.
37. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4 en la cual la estructura comprende un poli péptido positivamente cargado.

38. una composición de acuerdo con la reivindicación 37 en la cual la sutura comprende un polipéptido positivamente cargado que tiene un peso molecular de aproximadamente de 10.000 a aproximadamente 1.5000.000
- 39 Una composición de acuerdo con la reivindicación 37 en la cual la estructura comprende un polipéptido positivamente cargado que tiene un peso molecular de aproximadamente de 25.000 a aproximadamente 1.200.000.
- 40 Una composición de acuerdo con la reivindicación 37 en la cual la estructura comprende un polipéptido positivamente cargado que tiene un peso molecular de aproximadamente de 100 000 a aproximadamente 1.000.000.
41. Una composición de acuerdo con la reivindicación 37 en la cual la estructura comprende una polilisina positivamente cargada.
42. Una composición de acuerdo con la reivindicación 41 en la cual la estructura comprende una polilisina positivamente cargada que tiene un peso molecular que es de aproximadamente 10 000 a aproximadamente 1 500.000.
43. Una composición de acuerdo con la reivindicación 41 en la cual la estructura comprende una polilisina positivamente cargada que tiene un peso molecular de aproximadamente 25 000 a aproximadamente 1.200.000

44. Una composición de acuerdo con la reivindicación 41 en la cual la estructura comprende una polilisina positivamente cargada que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 1 000 000.
45. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4 en la cual la estructura comprende un polímero no peptídico positivamente cargado
46. Una composición de acuerdo con la reivindicación 45 en la cual la estructura de polímero no peptídico comprende una polialquilenimina positivamente cargada.
47. Una composición de acuerdo con la reivindicación 46 en la cual la polialquilenimina es una polietilenoimina.
48. Una composición de acuerdo con la reivindicación 47 en la cual la polietilenoimina tiene un peso molecular desde aproximadamente 10 000 a aproximadamente 2.500 000.
49. Una composición de acuerdo con la reivindicación 47 en la cual la polietilenoimina tiene un peso molecular desde aproximadamente 100.000 a aproximadamente 1 800.000.
50. Una composición de acuerdo con la reivindicación 47 en la cual la polietilenoimina tiene un peso molecular desde aproximadamente 500.000 a aproximadamente 1 400.000

51. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4 en la cual el vehículo comprende un polímero positivamente cargado que tiene unos grupos ramificados unidos positivamente cargados independientemente seleccionados de $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT y fragmentos de estos, y Antennapedia PTD y fragmentos o mezclas de estos, en el cual subíndice $n1$ es un entero desde 0 a aproximadamente 20, y el subíndice $n2$ es independientemente un entero impar desde aproximadamente a aproximadamente 25.
52. Una composición de acuerdo con la reivindicación 51 en la cual los grupos ramificados positivamente cargados son independientemente seleccionados de grupos que tienen la fórmula $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$.
53. Una composición de acuerdo con la reivindicación 52 en la cual el subíndice $n1$ es un entero desde 1 a aproximadamente 8.
54. Una composición de acuerdo con la reivindicación 52 en la cual el subíndice $n1$ es un entero desde aproximadamente 2 a aproximadamente 5.
55. Una composición de acuerdo con la reivindicación 52 en la cual el subíndice $n2$ es un número impar desde aproximadamente 7 a aproximadamente 17.

56. Una composición de acuerdo con la reivindicación 52 en la cual el subíndice n_2 es un número aleatorio desde aproximadamente 7 a aproximadamente 13.
57. Una composición de acuerdo con la reivindicación 51 en la cual los grupos ramificados son seleccionados de HIV-TAT y fragmentos de estos.
58. Una composición de acuerdo con la reivindicación 57 en la cual los grupos ramificados unidos positivamente cargados 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.
59. Una composición de acuerdo con la reivindicación 51 en la cual los grupos ramificados son grupos Antennapeedia PTD o fragmentos de estos.
60. Una composición de acuerdo con la reivindicación 51 en la cual el polímero positivamente cargado comprende un polipéptido.
61. Una composición de acuerdo con la reivindicación 60 en la cual el polipéptido se selecciona de polilisinas, poliargininas, poliornitinas, y polihomoargininas.
62. Una composición de acuerdo con la reivindicación 61 en la cual el polipéptido es una polilisina.

63. Una composición de acuerdo con la reivindicación 51 en la cual el polímero comprende un polímero no peptídico positivamente cargado.
64. Una composición de acuerdo con la reivindicación 63 en la cual el polímero no peptídico comprende una polialquilenimina positivamente cargada.
65. una composición de acuerdo con la reivindicación 64 en la cual la polialquilenimina es una polietilenimina.
66. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4 que contiene desde aproximadamente 1×10^{-20} a aproximadamente 25% en peso de agente biológicamente activo y desde aproximadamente 1×10^{-19} a aproximadamente 30% en peso de un vehículo positivamente cargado
67. Una composición de liberación controlada de acuerdo a la reivindicación 4.
68. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la cual la proteína biológicamente activa es una toxina de botulinum.
69. Una composición de acuerdo con la reivindicación 68 en la cual la toxina de botulinum se selecciona de los serotipos de toxina de botulinum A, B, C, D, E, F y G.

70. Una composición de acuerdo con la reivindicación 68 en la cual la toxina de botulinum comprende un derivado de toxina de botulinum
- 71 Una composición de acuerdo con la reivindicación 68 en la cual la toxina de botulinum comprende una toxina de botulinum recombinante.
- 72 Un Kit para la administración de una composición de acuerdo con la reivindicación 1 a un sujeto que comprende un dispositivo para suministrar un agente biológicamente activo y un vehículo que comprende una estructura positivamente cargada que tiene grupos ramificados unidos positivamente cargados y que están presentes en una cantidad efectiva para suministro transdérmico
- 73 UN kit de acuerdo con la reivindicación 72 en donde el agente biológicamente activo es una toxina de botulinum.
74. UN kit de acuerdo con la reivindicación 72 en la cual la composición esta contenida en un dispositivo para administrar una proteína biológicamente activa a un sujeto por vía de la piel o el epitelio.
75. UN kit de acuerdo con la reivindicación 74 en la cual el dispositivo es un parche de piel
76. UN kit para la administración de una proteína biológicamente activa a un sujeto que comprende un dispositivo para suministrar la proteína biológicamente activa la piel o el epitelio de una composición que comprende un vehículo positivamente cargado que tiene grupos

ramificados unidos positivamente cargados independientemente seleccionados de $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$ HIV-TAT y fragmentos de estos, y Antennapedia PTD y fragmentos o mezclas de estos, en los cuales el subíndice $n1$ es un entero desde 0 a aproximadamente 20, y el subíndice $n2$ es independiente mente un numero entero impar desde aproximadamente 5 a aproximadamente 25, en donde la asociación entre el vehículo y la proteína biológicamente activa es no covalente

77. Un Kit de acuerdo con la reivindicación 76 en la cual el dispositivo es un parche de piel.

78 Un método para administrar una proteína biológicamente activa que no altera terapéuticamente los niveles de glucosa en la sangre a un sujeto que comprende aplicar tópicamente a la piel o al epitelio del sujeto una proteína en conjunto con una cantidad efectiva de un vehículo positivamente cargado que comprende una estructura positivamente cargada que tiene unos grupos de ramificación unidos positivamente cargados, en donde la asociación entre el vehículo y la proteína biológicamente activa es no covalente.

79 El método de acuerdo con la reivindicación 78 en donde la composición suministra mayor suministro transdérmico de la proteína biológicamente activa con relación a la gente en la ausencia del vehículo.

80 Un método de acuerdo con la reivindicación 79 en la cual la proteína biológicamente activa tiene actividad terapéutica

81. Un método para administrar un agente biológicamente activo sin proteínas sin ácido nucleico a un sujeto que comprende aplicar tópicamente a la piel o al epitelio del sujeto un agente biológicamente activo en conjunto con una cantidad efectiva de un vehículo positivamente cargado que comprende una estructura positivamente cargada que tiene grupos ramificados unidos positivamente cargados en donde la asociación entre el vehículo y el agente biológicamente activo es no covalente
82. Un método de acuerdo con la reivindicación 81 en donde la composición provee mayor suministro transdérmico del agente biológicamente activo con relación al agente en ausencia del vehículo.
83. Un método de acuerdo con la reivindicación 82 en el cual el agente biológicamente activo tiene una actividad terapéutica.
84. Un método de acuerdo con la reivindicación 80 en el cual la proteína biológicamente activa y el vehículo se administran a un sujeto en una composición que contiene ambos componentes.
85. Un método de acuerdo con la reivindicación 80 en el cual la proteína biológicamente activa y el vehículo son administrados separadamente al sujeto.
86. Un método de acuerdo con la reivindicación 83 en el cual la proteína biológicamente activa y el vehículo son administrados al sujeto en una composición que contiene ambos componentes.

87. Un método de acuerdo con la reivindicación 83 en el cual el agente biológicamente activo y el vehículo son administrados separadamente al sujeto.
88. Un método de acuerdo con la reivindicación 80 en el cual la composición es una composición de liberación controlada a una composición de liberación sostenida.
89. Un método de acuerdo con la reivindicación 83 en el cual la composición es una composición de liberación controlada o una composición de liberación sostenida.
90. Un método de acuerdo con la reivindicación 80 en el cual la proteína terapéutica es una toxina de botulinum.
91. Un método de acuerdo con la reivindicación 90 en la cual la toxina de botulinum se selecciona de los serotipos de toxina botulinum A, B, C, D, E, F, y G.
92. Un método de acuerdo con la reivindicación 90 en la cual la toxina de botulinum comprende un derivado de toxina de botulinum
93. Un método de acuerdo con la reivindicación 90 en la cual la toxina de botulinum comprende una toxina de botulinum recombinante

94. Un método de acuerdo con la reivindicación 90 en la cual la toxina de botulinum se administra para suministrar un beneficio estético y/o cosmecéutico al sujeto
95. Un método de acuerdo con la reivindicación 90 en la cual la toxina de botulinum se administra al sujeto para prevenir o reducir los síntomas asociados con el espasmo muscular o espasmo doloroso.
96. Un método de acuerdo con la reivindicación 90 en el cual la toxina de botulinum y el vehículo positivamente cargado se administran tópicamente a un sitio en la cara del sujeto
97. Un método de acuerdo con la reivindicación 90 en el cual la toxina de botulinum y el vehículo positivamente cargado se administran tópicamente a un sitio sobre el sujeto diferente de la cara
98. Una composición que comprende un antígeno adecuado para la inmunización y un vehículo que comprende una estructura positivamente cargada que tiene unos grupos ramificados unidos positivamente cargados y que están presentes en una cantidad efectiva para el suministro transdérmico, en donde la asociación entre el vehículo y el antígeno es no covalente.
99. Una composición de acuerdo con la reivindicación 98 en la cual la estructura comprende un polipéptido positivamente cargado

- 100 Una composición de acuerdo con la reivindicación 99 en la cual la estructura comprende un polipéptido positivamente cargado que tiene un peso molecular desde aproximadamente 10.000 a aproximadamente 1 500 000.
101. Una composición de acuerdo con la reivindicación 99 en la cual la estructura comprende un polipéptido positivamente cargado que tiene un peso molecular desde aproximadamente 25.000 a aproximadamente 1.200.000.
102. Una composición de acuerdo con la reivindicación 99 en la cual la estructura comprende un polipéptido positivamente cargado que tiene un peso molecular desde aproximadamente 100.000 a aproximadamente 1.000 000
103. Una composición de acuerdo con la reivindicación 99 en la cual la estructura comprende una polilisina positivamente cargada
- 104 Una composición de acuerdo con la reivindicación 103 en la cual la estructura comprende una polilisina positivamente cargada que tiene un peso molecular desde aproximadamente 10.000 a aproximadamente 1.500 000
- 105 Una composición de acuerdo con la reivindicación 103 en la cual la estructura comprende una polilisina positivamente cargada que tiene un peso molecular desde aproximadamente 125.000 a aproximadamente 1 200 000

106. Una composición de acuerdo con la reivindicación 103 en la cual la estructura comprende una polilisina positivamente cargada que tiene un peso molecular desde aproximadamente 100 000 a aproximadamente 1 000.000
107. Una composición de acuerdo con la reivindicación 98 en la cual la estructura comprende un polímero no peptídico positivamente cargado.
108. Una composición de acuerdo con la reivindicación 107 en la cual la estructura del polímero no peptídico comprende una polialquilenimina positivamente cargada.
109. Una composición de acuerdo con la reivindicación 108 en la cual la polialquilenimina es una polietilenoimina.
110. Una composición de acuerdo con la reivindicación 109 en la cual la polietilenoimina tiene un peso molecular desde aproximadamente 10.000 a aproximadamente 2.500.000.
111. Una composición de acuerdo con la reivindicación 109 en la cual la polietilenoimina tiene un peso molecular desde aproximadamente 100.000 a aproximadamente 1.800.000.
112. Una composición de acuerdo con la reivindicación 109 en la cual la polietilenoimina tiene un peso molecular desde aproximadamente 500.000 a aproximadamente 1.400.000

113. Una composición de acuerdo con la reivindicación 98 en la cual el vehículo comprende un polímero positivamente cargado que tiene unos grupos ramificados unidos positivamente cargados independientemente seleccionados de $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT y fragmentos de estos, y Antennapedia PTD y fragmentos y mezclas de estos, en los cuales el subíndice $n1$ es un entero desde 0 a 20, y el subíndice $n2$ es independientemente un entero impar desde aproximadamente 5 a aproximadamente 25.

114 Una composición de acuerdo con la reivindicación 113 en la cual los grupos ramificados positivamente cargados son independientemente seleccionados de grupos que tienen la fórmula $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$

115. Una composición de acuerdo con la reivindicación 114 en la cual el subíndice $n1$ es un entero desde aproximadamente 1 a aproximadamente 8.

116 Una composición de acuerdo con la reivindicación 114 en la cual el subíndice $n1$ es un entero desde aproximadamente 2 a aproximadamente 5.

117 Una composición de acuerdo con la reivindicación 114 en la cual el subíndice $n2$ es un número aleatorio desde aproximadamente 7 a aproximadamente 17:

- 118 Una composición de acuerdo con la reivindicación 114 en la cual el subíndice n_2 es un número aleatorio desde aproximadamente 7 a aproximadamente 13.
- 119 Una composición de acuerdo con la reivindicación 113 en la cual los grupos ramificados se seleccionan de HIV-TAT y fragmentos de estos.
- 120 Una composición de acuerdo con la reivindicación 119 en la cual los grupos ramificados unidos positivamente cargados 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.
121. Una composición de acuerdo con la reivindicación 113 en la cual los grupos ramificados son grupos Antennapeedia PTD.
122. Una composición de acuerdo con la reivindicación 113 en los cuales los polímeros positivamente cargados comprenden un polipéptido.
- 123 Una composición de acuerdo con la reivindicación 122 en la cual el polipéptido se selecciona de polilisinas, poliargininas, y poliornitinas
124. Una composición de acuerdo con la reivindicación 123 en la cual el polipéptido es una polilisina.
125. Una composición de acuerdo con la reivindicación 113 en la cual el polímero comprende un polímero no peptídico positivamente cargado.

126 Una composición de acuerdo con la reivindicación 125 en la cual el polímero no peptídico comprende una polialquilenoimina positivamente cargada.

127 Una composición de acuerdo con la reivindicación 126 en la cual la polialquilenoimina es polietilenoimina.

128 Una composición de acuerdo con la reivindicación 98 que contiene desde aproximadamente 1×10^{-10} a aproximadamente 49.9% en peso del antígeno y desde aproximadamente 1×10^{-9} a aproximadamente 50% en peso de el vehículo positivamente cargado.

129. Una composición de liberación controlada de acuerdo a la reivindicación 98.

130. Una composición de acuerdo con la reivindicación 98 en la cual el antígeno es una toxina de botulinum.

131 Una composición de acuerdo con la reivindicación 130 en la cual la toxina de botulinum se selecciona de los serotipos de toxina de botulinum A, B, C, D, E, F y G.

132 Una composición de acuerdo con la reivindicación 130 en la cual la toxina de botulinum comprende un derivado de toxina de botulinum.

133. Una composición de acuerdo con la reivindicación 130 en la cual la toxina de botulinum comprende una toxina de botulinum recombinante
134. Una composición de acuerdo con la reivindicación 98 en la cual el antígeno es adecuado para inmunización en niños.
135. Un kit para la administración de un antígeno adecuado para la inmunización a un sujeto que comprende un dispositivo para suministrar el antígeno a la piel o el epitelio y una composición de acuerdo con la reivindicación 98.
136. Un kit de acuerdo con la reivindicación 135 que comprende además un aplicador de costumbre
137. Un kit de acuerdo con la reivindicación 135 en el cual la composición esta contenida en un dispositivo para administrar un antígeno adecuado para la inmunización a un sujeto por vía de la piel o el epitelio.
138. Un kit de acuerdo con la reivindicación 137 en la cual el dispositivo es un parche de piel.
139. Un kit para administración de un antígeno adecuado para la inmunización a un sujeto que comprende un dispositivo para suministrar el antígeno adecuado para la inmunización a la piel o el epitelio y una composición que comprende un vehículo positivamente cargado que tiene unos grupos ramificados unidos positivamente cargados independientemente seleccionados de $-(gly)_{n1}-(arg)_{n2}$, HIV-TAT y

fragmentos de éstos, y Antennapedia PTD y fragmentos y mezclas de éstos, en los cuales el subíndice n_1 es un entero de 0 a aproximadamente 20, y el subíndice n_2 es independientemente un entero impar de desde aproximadamente 5 a aproximadamente 25, en donde la asociación entre el vehículo y el antígeno es no covalente

140. Un kit de acuerdo con la reivindicación 139 en la cual el dispositivo es un parche de piel.

141. Un método para administrar un antígeno adecuado para la inmunización a un sujeto que comprende aplicar tópicamente en la piel o en epitelio del sujeto del antígeno adecuado para la inmunización en conjunto con una cantidad efectiva de un vehículo positivamente cargado que comprende una estructura positivamente cargada que tiene unos grupos ramificados unidos positivamente cargados, en donde la asociación entre el vehículo y el antígeno es no covalente

142. Un método de acuerdo con la reivindicación 141 en el cual el antígeno adecuado para la inmunización y el vehículo se administran al sujeto en una composición que contiene ambos componentes.

143. Un método de acuerdo con la reivindicación 141 en el cual el antígeno adecuado para la inmunización y el vehículo se administran separadamente al sujeto

144. Un método de acuerdo con la reivindicación 141 en el cual la estructura comprende un polipeptido positivamente cargado.

145 Un método de acuerdo con la reivindicación 144 en el cual la estructura comprende un poli péptido positivamente cargado que tiene un peso molecular de desde aproximadamente 10,000 a aproximadamente 1,500,000.

146. Un método de acuerdo con la reivindicación 144 en el
149 cual la estructura comprende un poli péptido positivamente cargado que tiene un peso molecular de desde aproximadamente 25,000 a aproximadamente 1,200,000.

147. Un método de acuerdo con la reivindicación 144 en la cual la estructura comprende un poli péptido cargado positivamente que tiene un peso molecular de desde aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,000,000

148 Un método de acuerdo con la reivindicación 144 en la cual la estructura comprende una poli lisina cargada positivamente

149. Un método de acuerdo con la reivindicación 148 en la cual la estructura comprende una poli lisina positivamente cargada que tiene un peso molecular de desde aproximadamente 10,000 a aproximadamente 1,500,000

150. Un método de acuerdo con la reivindicación 148 en la cual la estructura comprende una poli lisina positivamente cargada que tiene un

peso molecular de desde aproximadamente 25,000 a aproximadamente 1,200,000.

151 Un método de acuerdo con la reivindicación 148 en la cual la estructura comprende una poli lisina positivamente cargada que tiene un peso molecular de desde aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,000,000.

152. Un método de acuerdo con la reivindicación 141 en la cual la estructura comprende un polímero no peptídico positivamente cargado.

153 Un método de acuerdo con la reivindicación 152 en el cual la estructura de polímero no peptídico comprende una poli alqueno imina positivamente cargada.

154 Un método de acuerdo con la reivindicación 153 en el cual la poli alqueno imina es una poli etileno imina.

155. Un método de acuerdo con la reivindicación 154 en el cual la poli etileno imina tiene un peso molecular de desde aproximadamente 10,000 a aproximadamente 2,500,000.

156. Un método de acuerdo con la reivindicación 154 en el cual la poli etileno imina tiene un peso molecular de desde aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,800,000.

157. Un método de acuerdo con la reivindicación 154 en el cual la poli etileno imina tiene un peso molecular de desde aproximadamente 500,000 a aproximadamente 1,400,000

158. Un método de acuerdo con la reivindicación 141 en el cual el vehículo comprende un polímero positivamente cargado que tiene grupos ramificados unidos positivamente cargados independientemente seleccionados de

$-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT y fragmentos de éstos, y Antennapedia PTD y fragmentos o mezclas de éstos, en los cual el subíndice $n1$ es un entero de 0 a aproximadamente 20, y el subíndice $n2$ es independientemente un entero impar de desde aproximadamente 5 a aproximadamente 25.

159 Un método de acuerdo con la reivindicación 158 en el cual los grupos ramificados positivamente cargados son independientemente seleccionados de grupos que tienen la formula $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$.

160 Un método de acuerdo con la reivindicación 159 en el cual el subíndice $n1$ es un entero de desde aproximadamente 1 a aproximadamente 8.

161 Un método de acuerdo con la reivindicación 159 en el cual el subíndice $n1$ es un entero de desde aproximadamente 2 a aproximadamente 5.

162. Un método de acuerdo con la reivindicación 159 en el cual el subíndice n_2 es un entero impar de desde aproximadamente 7 a aproximadamente 17.
163. Un método de acuerdo con la reivindicación 159 en el cual el subíndice n_2 es un entero impar de desde aproximadamente 7 a aproximadamente 13.
164. Un método de acuerdo con la reivindicación 158 en el cual los grupos ramificados se seleccionan de HIV-TAT y fragmentos de éstos.
165. Un método de acuerdo con la reivindicación 164 en el cual los grupos ramificados unidos positivamente cargados son fragmentos HIV-TAT que tienen la formula $(\text{gly})_p\text{-RGRDDRRQRRR-(gly)}_q$, $(\text{gly})_p\text{-YGRKKRRQRRR-(gly)}_q$, o $(\text{gly})_p\text{-RKKRRQRRR-(gly)}_q$ en donde los subíndices p y q son cada uno independientemente un entero desde 0 a 20.
166. Un método de acuerdo con la reivindicación 158 en el cual los grupos ramificados son grupos Antennapedia PTD.
167. Un método de acuerdo con la reivindicación 158 en el cual el polímero positivamente cargado comprende un poli péptido.
168. Un método de acuerdo con la reivindicación 167 en el cual el poli péptido se selecciona de poli lisinas, poli argininas, y poli ornitinas.

169. Un método de acuerdo con la reivindicación 168 en el cual el polipéptido es una poli lisina.
170. Un método de acuerdo con la reivindicación 158 en el cual el polímero comprende un polímero no peptídico positivamente cargado.
171. Un método de acuerdo con la reivindicación 170 en el cual el polímero no peptídico comprende una poli alquileo imina positivamente cargada.
172. Un método de acuerdo con la reivindicación 171 en el cual la poli alquileo imina es una poli etileno imina
173. Un método de acuerdo con la reivindicación 141 en el cual la composición es una composición de liberación controlada
174. Un método de acuerdo con la reivindicación 141 en el cual el antígeno adecuado para la inmunización es una toxina de botulinum
175. Un método de acuerdo con la reivindicación 174 en el cual la toxina de botulinum se selecciona de los serotipos de toxina de botulinum A, B, C, D, E, F y G.
180. Un método de acuerdo con la reivindicación 141 en el cual el antígeno adecuado para la inmunización se administra para suministrar resistencia a un patógeno potencial.

181. Un método de acuerdo con la reivindicación 141 en el cual en antígeno adecuado para la inmunización se administra para suministrar resistencia a un bioriesgo potencial.
182. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4 en el cual el agente biológicamente activo es un agente antifúngico
183. Una composición de acuerdo con la reivindicación 182 que contiene desde aproximadamente 1×10^{-10} a aproximadamente 49.9% en peso y que el agente biológicamente activo es de 1×10^{-9} a aproximadamente 50% en peso del vehículo positivamente cargado.
184. Una composición de liberación controlada de acuerdo con la reivindicación .
185. Una composición de acuerdo con la reivindicación 182 en la cual el agente antifúngico se selecciona de anfotericina B, fluconazol, flucitosina, itraconazol, zetoconazol, clotrimazol, econazol, griseofulvin, miconazol, nistatina, y ciclopirox
186. Un kit para administración de un agente antifúngico a un sujeto que comprende un dispositivo para suministrar el agente antifúngico a la piel o el epitelio del sujeto y una composición de acuerdo con la reivindicación 182
187. Un kit de acuerdo con la reivindicación 186 que comprende además un aplicador de costumbre

- 188 Un kit de acuerdo con la reivindicación 186 en el cual la composición está contenida en un dispositivo para administrar un agente antifúngico a un sujeto por vía de una placa de uña o estructuras anatómicas adyacentes
189. Un kit de acuerdo con la reivindicación 186 en el cual el dispositivo es una placa de una prótesis o una laca.
190. Un método de acuerdo con la reivindicación 81 en el cual el agente biológicamente activo es un agente antifúngico.
191. Un método de acuerdo con la reivindicación 190 en el cual el agente antifúngico y el vehículo se administran a un sujeto y una composición que contiene ambos componentes.
192. Un método de acuerdo con la reivindicación 190 en el cual el agente antifúngico y el vehículo se administran separadamente al sujeto.
193. Un método de acuerdo con la reivindicación 190 en el cual la composición es una composición de liberación controlada.
- 194 Un método de acuerdo con la reivindicación 190 en el cual el agente antifúngico se selecciona de anfotericina B, fluconazol, flucitosina, itraconazol, zetoconazol, clotrimazol, econazol, griseofulvin, miconazol, nistatina, y ciclopirox.

195. Un método de acuerdo con la reivindicación 190 en el cual el agente antifúngico se administra para tratar los síntomas y signos de una infección fúngica.
196. Un método de acuerdo con la reivindicación 190 en el cual el agente antifúngico se administra para alterar los síntomas o signos de la infección fúngica de la placa de uña o del lecho de uña.
197. Un polipéptido cargado positivamente o un polímero no peptídico que tiene unos grupos ramificados unidos positivamente cargados independientemente seleccionados de $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$, HIV-TAT y fragmentos de estos, y Antennapedia PTD y fragmentos y mezclas de estos, en los cuales el subíndice $n1$ es un entero desde 0 a aproximadamente 20, y el subíndice $n2$ es independiente un entero impar desde aproximadamente 5 a aproximadamente 25.
198. Un polipéptido positivamente cargado o un polímero no peptídico de acuerdo con la reivindicación 197 en el cual los grupos ramificados positivamente cargados son independientemente seleccionados de grupos que tienen la fórmula $-(\text{gly})_{n1}-(\text{arg})_{n2}$.
199. Un polipéptido positivamente cargado o un polímero no peptídico de acuerdo con la reivindicación 198 en el cual el subíndice $n1$ es un entero desde 1 a aproximadamente 8.

200. Un polipéptido positivamente cargado o un polímero no peptídico de acuerdo con la reivindicación 198 en el cual el subíndice n_1 es un entero desde aproximadamente 2 a aproximadamente 17.

201. Un polipéptido positivamente cargado o un polímero no peptídico de acuerdo con la reivindicación 198 en el cual el subíndice n_2 es un número impar desde aproximadamente 7 a aproximadamente 17.

202. Un polipéptido positivamente cargado o un polímero no peptídico de acuerdo con la reivindicación 198 el cual el subíndice n_2 es un número impar desde aproximadamente 7 a aproximadamente 13.

203. Un polipéptido positivamente cargado o un polímero no peptídico de acuerdo con la reivindicación 197 en el cual los grupos ramificados se seleccionan de HIV-TAT y fragmentos de estos.

204. Un polipéptido positivamente cargado o un polímero no peptídico de acuerdo con la reivindicación 203 en el cual los grupos ramificados unidos positivamente cargados son fragmentos HIV-TAT que 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 son cada uno independientemente un entero de 0 a 20.

205. Un polipéptido positivamente cargado o un polímero no peptídico de acuerdo con la reivindicación 197 en el cual los grupos ramificados son grupos Antennapedia PTD o fragmentos de estos

206. Un polipéptido positivamente de acuerdo con la reivindicación 197 en el cual el vehículo positivamente cargado comprende un polipéptido.

207. Un polipéptido positivamente cargado de acuerdo con la reivindicación 206 en el cual el polipéptido se selecciona de polilisinas, poliargininas, poliornitinas, y polihomoargininas

208. Un polipéptido positivamente cargado de acuerdo con la reivindicación 107 en el cual el polipéptido es una polilisina.

209. Un polipéptido positivamente cargado de acuerdo con la reivindicación 197 en el cual el vehículo positivamente cargado comprende un polímero no peptídico positivamente cargado

210. Un polipéptido positivamente cargado de acuerdo con la reivindicación 209 en el cual el polímero no peptídico comprende una polialquileimina positivamente cargada.

211. Un polipéptido positivamente cargado de acuerdo con la reivindicación 210 en el cual la polialquileimina es una polietileneimina

212. Una composición que comprende un complejo no covalente de:

- a) Una estructura positivamente cargada, y
- b) Al menos dos miembros seleccionados del grupo que consiste de:

- i) una estructura negativamente cargada que tiene una pluralidad de porciones de imágenes unidas o alternativamente una pluralidad de porciones de imagen negativamente cargadas;
- ii) una estructura negativamente cargada que tiene una pluralidad de agentes blanco unidos, o alternativamente una pluralidad de porciones blanco negativamente cargado.
- iii) al menos un miembro seleccionado de ARN, ADN, ribosomas, oligonucleótidos modificados y cADN que codifican un transgen seleccionado;
- iv) ADN que codifica al menos un factor de persistencia;
- v) una estructura negativamente cargada que tiene una pluralidad de agentes biológicos unidos, o alternativamente un agente biológico negativamente cargado,

en donde el complejo lleva una carga positiva neta y al menos uno de los miembros se selecciona de i), ii), iii), o v).

213. Un método para preparar una composición farmacéutica o cosmecéutica, el método comprende combinar el componente de estructura positivamente cargado y al menos dos miembros seleccionados del grupo que consiste de:

- i) Una estructura negativamente cargada que tiene una pluralidad de porciones de imágenes unidas, o alternativamente una pluralidad de porciones de imágenes negativamente cargadas;
- ii) Una estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes blanco unidos, o alternativamente una pluralidad de porciones blanco negativamente cargadas,

- iii) Al menos un miembro seleccionado de ARN, ADN, ribosomas, ácidos oligonucleicos modificados y cADN que codifica un trangen seleccionado;
- iv) ADN que codifica al menos un factor de persistencia; y
- v) Una estructura negativamente cargada que tiene una pluralidad de agentes biológicos unidos o agentes cosmeceúticos, o un agente biológico negativamente cargado o un agente cosmeceútico;

Con un vehículo farmacéutica o cosmeceúticamente aceptable para formar un complejo no covalente que tiene una carga positiva neta, y al menos uno de los miembros es seleccionado de i), ii), iii), o v).

214 Una composición que comprende insulina y una cantidad efectiva para suministro transdérmico de insulina de un vehículo que comprende una estructura positivamente cargada que tiene grupos ramificados unidos positivamente cargados en donde la asociación entre el vehículo y la insulina es no covalente.

215 Una composición de acuerdo con la reivindicación 214 que contiene insulina y un vehículo positivamente cargado en una proporción en peso desde aproximadamente 30:1 a aproximadamente 1:01

216. Una composición de liberación controlada de acuerdo con la reivindicación 214.

217. Un kit para la administración de insulina a un sujeto que comprende insulina y un vehículo que comprende una estructura positivamente cargada que tiene grupos ramificados unidos positivamente cargados y

está presente en una cantidad efectiva para suministro transdérmico, en donde la asociación entre el vehículo y la insulina es no covalente

218 Un kit de acuerdo con la reivindicación 217 en el cual la composición está contenida en un dispositivo para administrar insulina a un sujeto por vía de la piel o el epitelio.

219 Un método para administrar insulina a un sujeto que comprende aplicar tópicamente a la piel o al epitelio del sujeto insulina en conjunto con una cantidad efectiva de un vehículo positivamente cargado que comprende una estructura positivamente cargada que tiene grupos ramificados unidos positivamente cargados, en donde la asociación entre el vehículo y la insulina es no covalente

220. El método de acuerdo con la reivindicación 219 en la cual la composición de liberación controlada

221 Una composición que comprende una porción de imagen y un agente blanco y un vehículo que comprende una estructura positivamente cargada que tiene unos grupos ramificados unidos positivamente cargados y que está presente en una cantidad efectiva para el suministro transdérmico, en donde la asociación entre el vehículo y la proteína biológicamente activa es no covalente

222 Una composición de acuerdo con la reivindicación 221, en donde la porción de imagen y el agente blanco son física y químicamente distintos

223. Una composición de acuerdo con la reivindicación 221, en donde la porción de imagen y agente blanco no son ambos fosfato
224. Una composición de acuerdo con la reivindicación 221 en la cual el agente de imagen es un agente de imagen óptico
225. Una composición de acuerdo con la reivindicación 224 en el cual el agente de imagen se selecciona de Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, Oregon green 488, Oregon green 500, Oregon, green 514, proteína fluorescente Green, 6-FAM, Texas Red, Hex, TET, y HAMRA.
226. Una composición de acuerdo con la reivindicación 221 en la cual el agente de imagen es adecuado para imágenes de resonancia magnética.
227. Una composición de acuerdo con la reivindicación 221 en la cual el agente de blanco reconoce el melanoma.
228. Un kit para la administración de una composición de acuerdo con la reivindicación 221 a un sujeto que comprende un dispositivo para suministrar la imagen en las porciones de blanco y un vehículo que comprende una estructura positivamente cargado que tiene grupos ramificados unidos positivamente cargados y que esta presente en una cantidad efectiva para el suministro transdérmico
229. Un método para administrar una porción de imagen y una agente de blanco a un sujeto que comprende aplicar tópicamente a la piel o al epitelio del sujeto la porción de imagen que el agente de blanco en

conjunto con una cantidad efectiva de un vehículo positivamente cargado que comprende una estructura positivamente cargada que tiene grupos ramificados unidos positivamente cargados en donde el asocio entre el vehículo y la proteína biológicamente activa es no covalente.

230. Una composición de acuerdo con la reivindicación 229 en donde la *porción de imagen del agente de blanco son física o químicamente distintos.*

231. El método de acuerdo con la reivindicación 229, en donde la *porción de imagen y el agente de blanco no son ambos fosfato.*

232. El método de acuerdo con la reivindicación 229 en el cual el agente de imagen es un agente de imagen óptico.

233 El método de acuerdo con la reivindicación 224 en el cual el agente de imagen se selecciona de Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5 5, Cy7, Cy7.5, Oregon green 488, Oregon green 500, Oregon, green 514, proteína fluorescente Green, 6-FAM, Texas Red, Hex, TET, y HAMRA.

234. El método de acuerdo con la reivindicación 229 en el cual el agente de imagen es adecuado para las *imágenes de resonancia magnética.*

235. El método de acuerdo con la reivindicación 229 en el cual el agente de blanco reconoce el melanoma

236 El método de acuerdo con la reivindicación 229 en el cual la composición se aplica para escoger pacientes con riesgo de melanoma.

237. El método de acuerdo con la reivindicación 229 en el cual la composición se aplica para ayuda en escisión quirúrgica de melanoma.

238. El método de acuerdo con la reivindicación 229 en el cual la composición se aplica en conjunto con técnicas fotográficas o técnicas de análisis de imagen.

239. Una composición que comprende un complejo no covalente de

- a) una estructura cargada positivamente; y
- b) al menos dos miembros seleccionados del grupo que consiste de:
 - i) Una estructura negativamente cargada que tiene una pluralidad de porciones de imágenes unidas; o una pluralidad de porciones de imágenes negativamente cargadas;
 - ii) Una estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes blanco unidos; o una pluralidad de porciones blanco negativamente cargadas; y
 - iii) Una estructura negativamente cargada que tiene una pluralidad de agentes biológicos, o un agente biológico negativamente cargado,

En donde el vehículo lleva una carga positiva neta y al menos uno de los miembros se selecciona de i), ii), iii) o v)

240. Un método para preparar una composición farmacéutica cosmeceútica, el método comprende combinar un componente de

estructura positivamente cargado y al menos dos miembros seleccionados del grupo que consiste de.

- i) Una estructura negativamente cargada que tiene una pluralidad de porciones de imágenes o alternativamente, una pluralidad de porciones de imágenes negativamente cargadas;
- ii) Una estructura cargada negativamente que tiene una pluralidad de agentes blanco unidos, o alternativamente una pluralidad de porciones blanco negativamente cargadas;
- iii) Una estructura negativamente cargada que tiene una pluralidad de agentes biológicos unidos o agentes cosmecéuticos, o un agente biológico negativamente cargado o un agente cosmecéutico;

Con un vehículo farmacéutica o cosmecéuticamente aceptable para formar un complejo no covalente que tiene una carga positiva neta, con la condición de que al menos uno de los miembros se selecciona de i), ii), iii) o v).

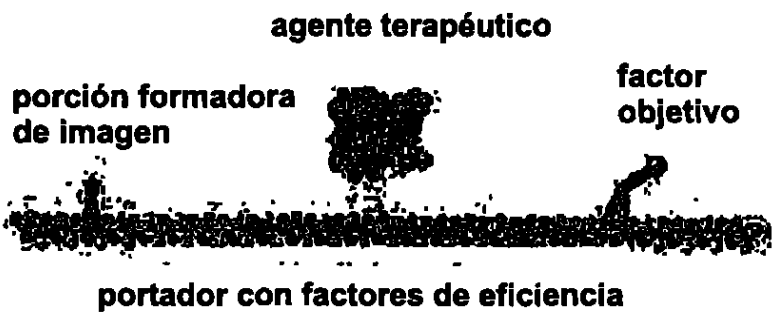


FIGURA 1



FIGURA 2

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

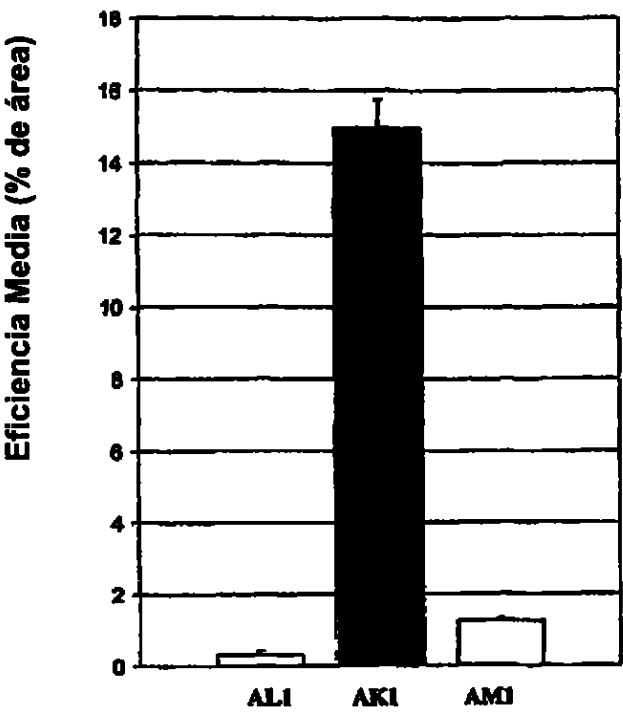


FIGURA 3 (% de células que muestran positivo)

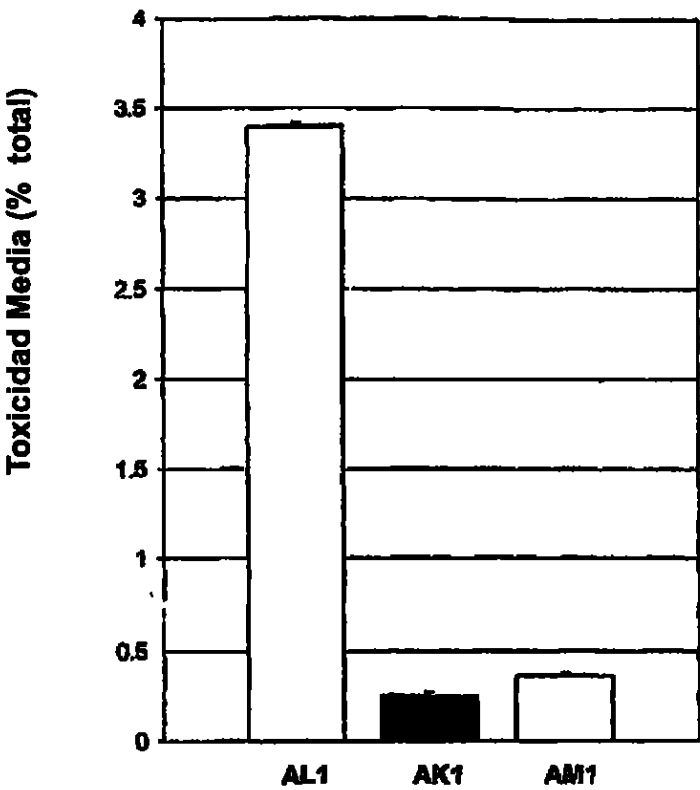


FIGURA 4 (% de células no viables media)

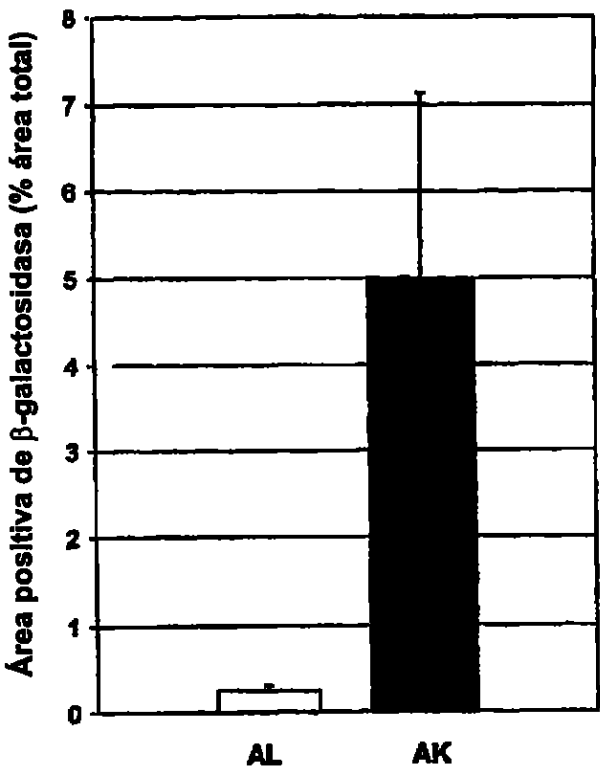


FIGURA 5 (7 días de administración una vez diariamente)

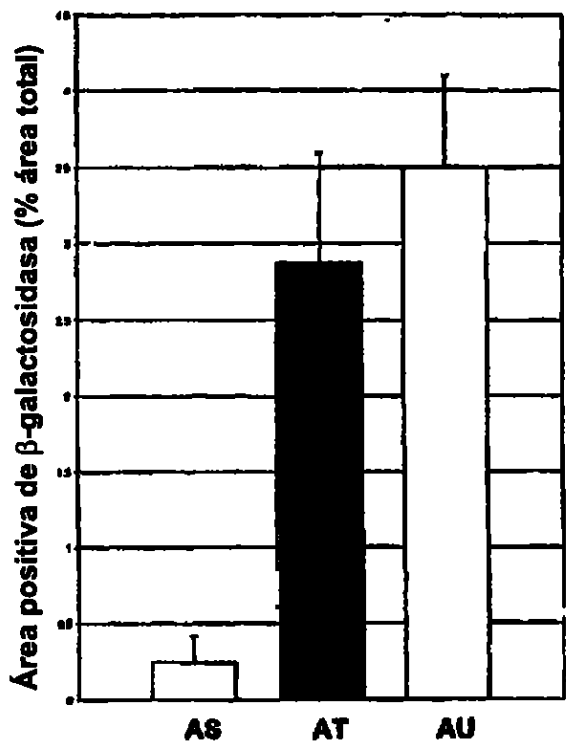


FIGURA 6 (eficiencia de suministro transdérmico)

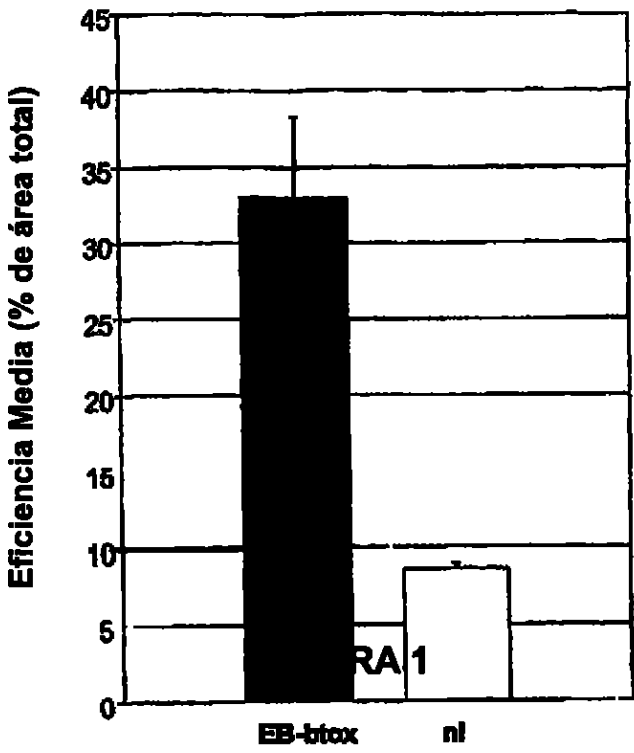


FIGURA 7 (eficiencia de suministro transdérmico)



FIGURA 8

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

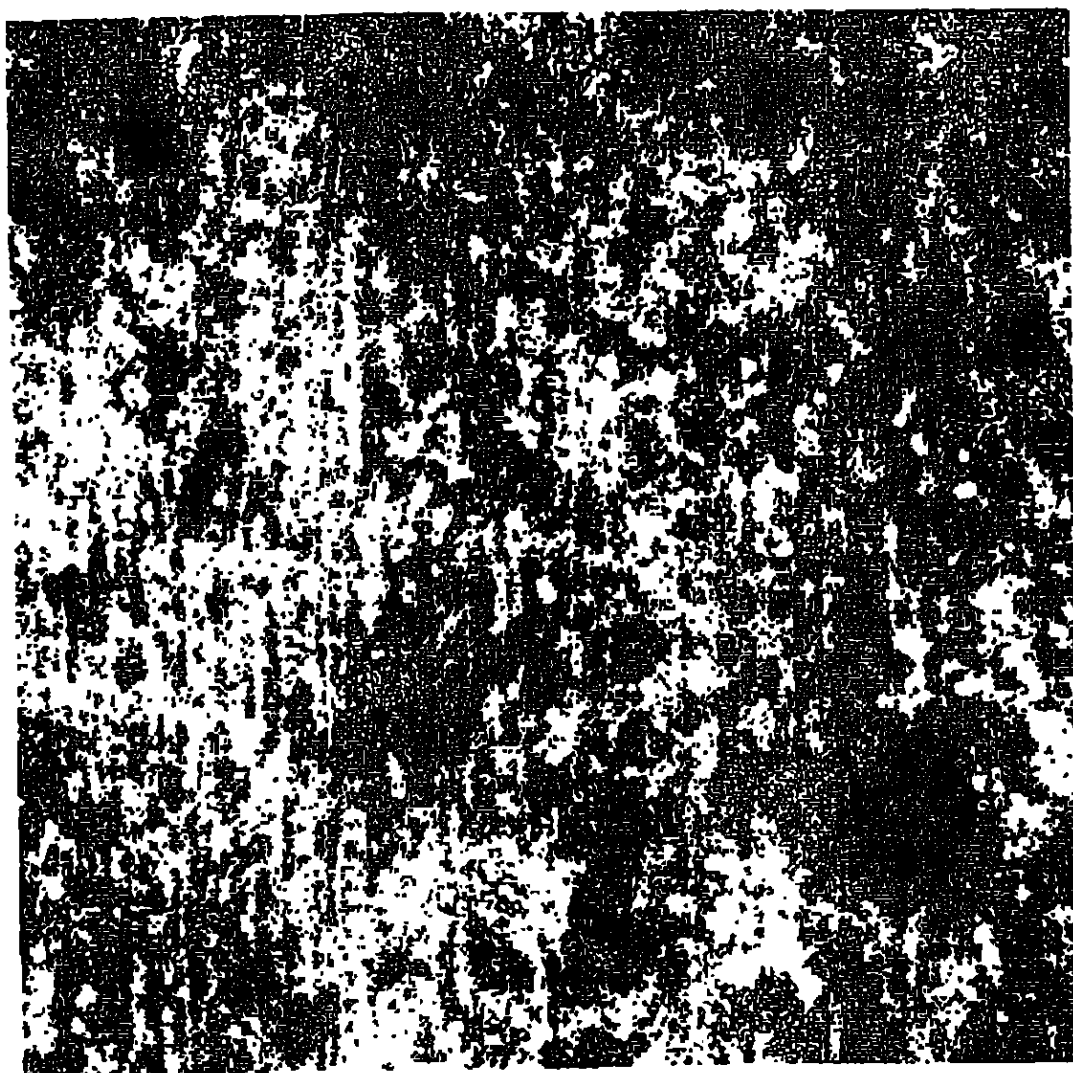


FIGURA 9A

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

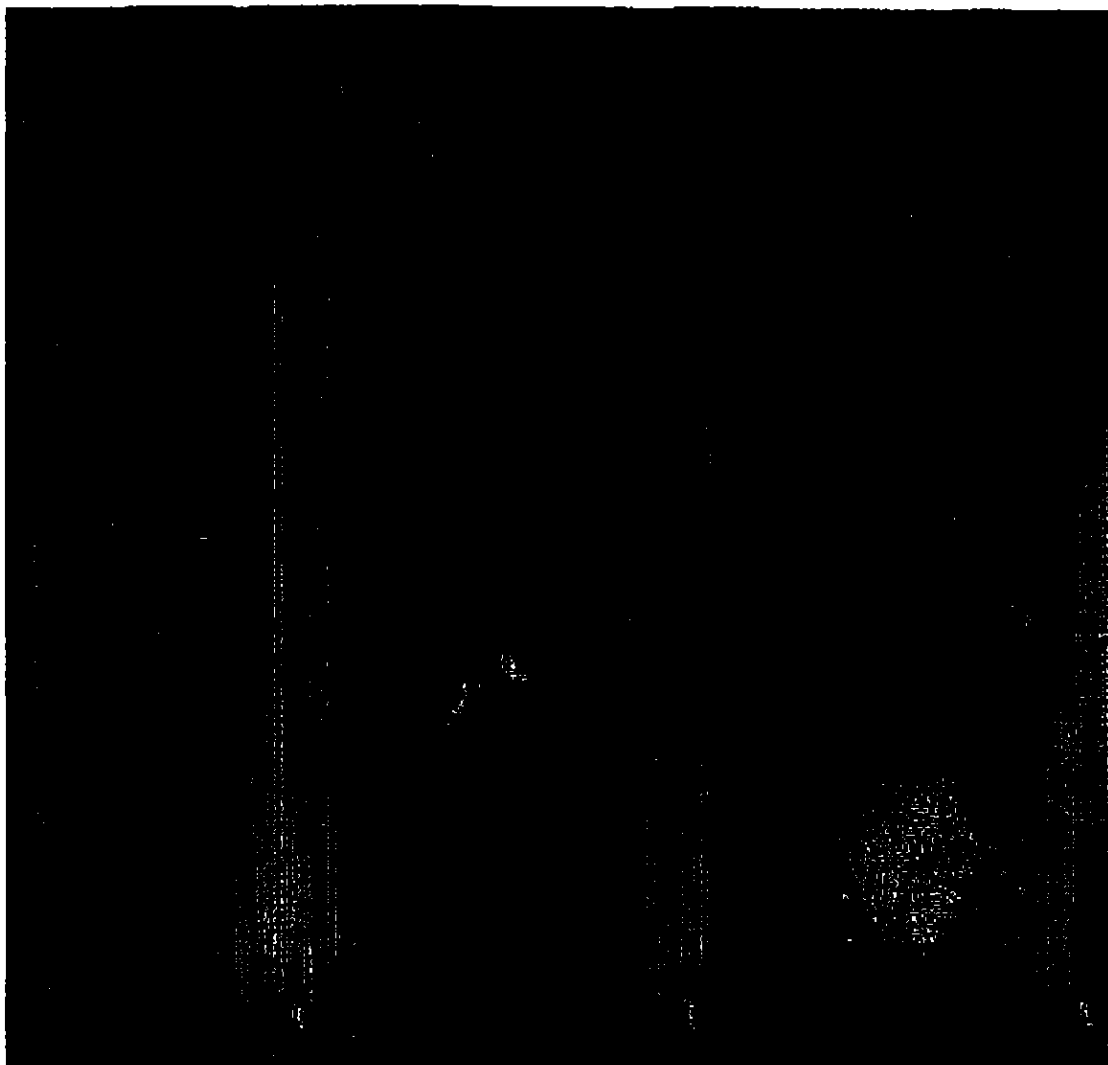


FIGURA 9B

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

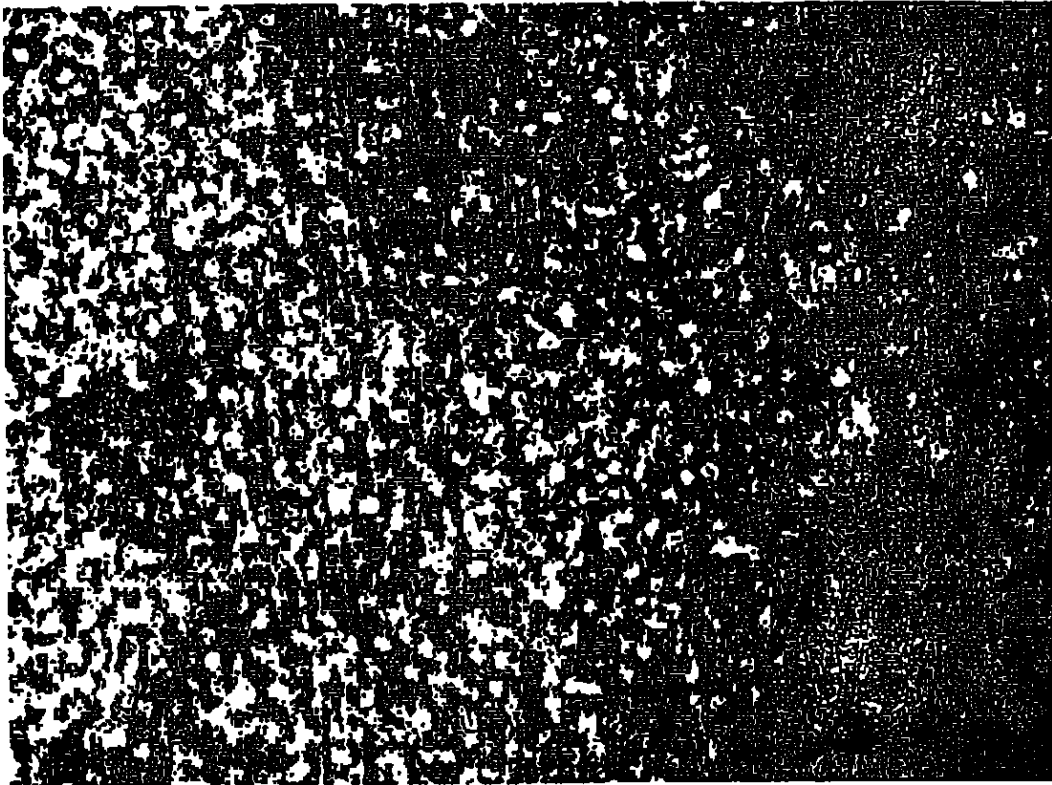


FIGURA 9C

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)



FIGURA 9D

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

 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: 06-98643 22) Fecha de solicitud: 24/09/06 (30) Prioridad (31) 10/793,138 (32) 03/03/04 (33) US		(51) Int Cl: A61K 38/00 (71) Solicitante(s): ESSENTIA BIOSYSTEMS, INC. (72) Inventor(es): JACOB M. WAUGH MICHAEL D. DAKE (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/US2005/006930		(87) Publicación internacional Fecha: 15/09/2005 N° publicación: WO 2005/084361 A2	
(54) Título: SISTEMA DE TRANSPORTE BIOLOGICO MULTICOMPONENTE			

Reivindicación(es).

1. Una composición que comprende una proteína biológicamente activa que no altera terapéuticamente los niveles de glucosa de la sangre y un vehículo que comprende una estructura positivamente cargada que tiene unos grupos ramificados unidos positivamente cargados y que están presentes en una cantidad efectiva para el suministro transdérmico, en donde la asociación entre el vehículo y la proteína biológicamente activa es no covalente
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la composición suministra mayor suministro transdérmico de la proteína biológicamente activa con relación al agente en la ausencia del vehículo
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2 en la cual la proteína biológicamente activa tiene una actividad terapéutica.
4. Una composición que comprende un agente biológicamente activo sin proteína sin ácido nucleico y un vehículo que comprende una estructura positivamente cargada que tiene unos grupos ramificados unidos positivamente cargados y que esta presente en una cantidad efectiva para el suministro transdérmico, en donde la asociación entre el vehículo y el agente biológicamente activo es no covalente
5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4 en donde la composición suministra mayor suministro transdérmico del agente biológicamente activo con relación al agente en la ausencia del vehículo
6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5 en la cual el agente biológicamente activo tiene una actividad terapéutica



FORMATO DE DIGITALIZACION
RELACION DE ANEXOS



Royal
Technologies S.A.
Bogotá, Colombia

Expediente No		06-098643	No de Folia
Item		No de unidades	
1	CD		
2	DVL		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOPORTE DE MANILA		
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA X	1	✓
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS		

Observaciones

CONTIENE ANEXO FINAL

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-098643-00000-0000
Fec: 2006-09-29 17:54:43 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra 11 PATENTEYII
Eve 379 FASENACIONAL
Act 111 PRESENTACIONAL FOLIO 280

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CASH : 06 - 73,832
FECHA : SEPTIEMBRE 25 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	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
		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	\$ 463,000.00

SCH: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

060 15550-841-001-8



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

2a1
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-098643-00000-0000
Fec 2006-09-29 17:54:43 Dep 2020 NUECREACIONES
Tra 11 PATENTEYII
Eve 378 FASENACIONALI
ANEXOS PRESENTACION

Delegatura de Propiedad Industrial División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

PATENTE DE INVENCION ()	MODELO DE UTILIDAD ()	USUARIO ()	RADICADOR ()
-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 ()

-Indicacion 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 ()

-Indicacion 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

Spt 29 de 2006

202

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCI

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO

REFERENCIA	Radicación No.	06 98643
	Solicitud internacional	PCT/US2005/006930
	Fecha inicio fase nacional	03/10/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

13533

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:

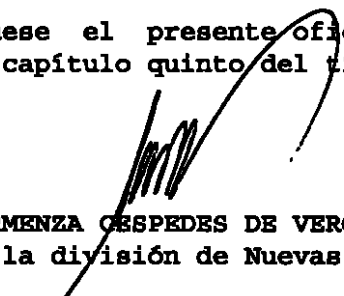
1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

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.

3. Debe aclarar el número de reivindicaciones, por cuanto la publicación presentada en fase nacional presenta inconsistencias en la numeración.

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 GONZALEZ DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 24 NOV. 2006
a alvarado