

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 630**

51 Int. Cl.:

A61K 47/42 (2007.01)

A61K 47/34 (2007.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.08.2015 PCT/JP2015/073745**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2016 WO16075977**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2015 E 15859435 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3219330**

54 Título: **Síntesis de nanoagregado de quitosano modificado mediante un péptido de autoensamblable y su aplicación para el transporte de proteínas**

30 Prioridad:

14.11.2014 JP 2014231447

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

10.06.2020

73 Titular/es:

**3-D MATRIX, LTD. (50.0%)
2-4, Kojimachi 3-chome, Chiyoda-ku
Tokyo 102-0083, JP y
TOKYO UNIVERSITY OF SCIENCE FOUNDATION
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**OTSUKA, HIDENORI y
MATSUKUMA, DAISUKE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 765 630 T3

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

DESCRIPCIÓN

Síntesis de nanoagregado de quitosano modificado mediante un péptido de autoensamblable y su aplicación para el transporte de proteínas

5 [Campo técnico]

La presente invención se refiere a un nanogel que comprende un péptido autoorganizable, un quitosano y polietilenglicol.

10 [Estado de la técnica]

Con el reciente enfoque en la terapia con el DDS que usa proteínas bioactivas como medicamento es, se han realizado numerosos estudios sobre portadores funcionales para expresar una actividad farmacológica efectiva. Sin embargo, la desnaturalización y la baja eficiencia de encapsulación de las proteínas en los portadores siguen siendo problemas importantes, y existe la necesidad de un diseño de portador que aumente la eficiencia de encapsulación pero no dañe la estructura estereoscópica de las proteínas. Por otro lado, los péptidos autoorganizables que tienen ciertas secuencias de aminoácidos construyen redes autoorganizables basadas en la formación de la estructura de lámina β. Se anticipa que si se puede crear un nanoportador que use una red de péptidos autoorganizable que tenga una excelente biocompatibilidad como matriz transportadora, dará como resultado un nuevo portador del DDS capaz de mantener la estabilidad estructural de las proteínas. Uno de tales DDS se describe en el documento WO 2014/133027 A1. Cuenta con un hidrogel que contiene quitosano, PEG y un péptido autoensamblable de secuencia RADARADARADARADA.

25 [Sumario de la invención]

[Problema técnico]

La presente invención proporciona un nuevo portador del DDS capaz de mantener la estabilidad estructural de las proteínas.

30 [Solución al problema]

La presente invención es como sigue:

35 [1] Un sistema de transporte de fármacos que comprende una proteína y un nanogel que encapsula la proteína, comprendiendo el nanogel un péptido autoorganizable, un quitosano y polietilenglicol, en el que el péptido autoorganizable es RADARADARADARADAGGGC.

40 [2] El nanogel como en [1], con el péptido autoorganizable RADARADARADARADAGGGC para su uso como medicamento.

[Efecto ventajoso de la invención]

45 El nanogel de la presente invención tiene excelentes características de liberación sostenida sin dañar la función de una proteína.

[Breve descripción de los dibujos]

50 La Figura 1 muestra los resultados de la medición de peso encapsulado en un agregado cuando los equivalentes del revestimiento previo RADA varían.

La Figura 2 muestra los resultados de la medición de peso encapsulado en un agregado con respecto al FITC-BSA agregado.

55 La Figura 3 muestra una evaluación del comportamiento de liberación de FITC-BSA. La fila superior es una representación de la velocidad de liberación, y la fila inferior es una representación del peso de liberado.

La Figura 4 muestra el equilibrio de la sustancia encapsulada/liberada.

La Figura 5 muestra los resultados de la evaluación de la estabilidad estructural de la albúmina modificada con RADA.

La Figura 6 muestra los resultados de la evaluación de la estabilidad estructural de la albúmina modificada con RADA.

La Figura 7 muestra los resultados de la medición del espectro de CD de FITC-lisozima.

60 La Figura 8 muestra los resultados de la medición de peso encapsulado en FITC-lisozima cuando se varían los equivalentes de revestimiento previo de RADA.

La Figura 9 muestra los resultados de la medición de la eficiencia de encapsulación en un agregado relativo a la FITC-lisozima agregada.

La Figura 10 muestra una evaluación del comportamiento de liberación de FITC-lisozima.

65 La Figura 11 muestra el equilibrio de la sustancia encapsulada/liberada de FITC-lisozima.

La Figura 12 muestra la actividad bacteriolítica de la lisozima previamente recubierta con RADA.

[Realizaciones de la invención]

El péptido autoorganizable utilizado en la presente invención tiene la secuencia RADARADARADARADAGGGC.

5 El terminal N del mismo puede estar acetilado, y el terminal C puede estar amidado.

El péptido autoorganizable utilizado en la presente invención es una variante del péptido RADARADARADARADA (PuraMatrix®), es decir, RADARADARADARADAGGGC (RADAGGGC), que es una forma modificada del extremo del mismo.

10 El quitosano es un producto de desacetilación de quitina (β -1,4-poli-N-acetilglucosamina), y es un polisacárido que tiene principalmente una estructura de β -1,4-poliglucosamina. El quitosano de la presente invención incluye derivados convencionalmente conocidos, por ejemplo, carboximetilquitosano.

15 El quitosano se puede preparar por cualquier método conocido en este campo. Por ejemplo, el quitosano puede obtenerse mediante desacetilación mediante tratamiento con álcali (por ejemplo, tratamiento con soda cáustica) de quitina obtenida mediante tratamiento descalcificante y tratamiento de desproteización de una materia prima como las conchas de crustáceos como el cangrejo, los camarones y el krill, o conchas de insectos como escarabajos y saltamontes. Además, en lugar de las conchas mencionadas anteriormente, la materia prima de quitosano puede ser de hongos, microbios, columna vertebral de calamar, etc.

20 Se conocen quitosanos de diversos pesos moleculares. En la composición acuosa de la presente invención, el peso molecular del quitosano no está particularmente limitado, pero el peso molecular promedio en peso es preferiblemente de 1000 a 1.000.000, y más preferiblemente de 10.000 a 300.000. El peso molecular promedio en peso también puede denominarse "peso molecular absoluto promedio en peso".

25 El peso molecular promedio en peso del quitosano se puede medir por cualquier método conocido en este campo. Por ejemplo, el peso molecular promedio en peso puede medirse mediante métodos tales como cromatografía de permeación en gel-dispersión de luz láser multiangular (GPC-MALS), medición de peso molecular absoluto por presión de vapor o medición de peso molecular absoluto por membrana. El peso molecular promedio en peso del quitosano debe estar dentro del intervalo de valores numéricos antes mencionado cuando se usa al menos uno de los métodos de medición y condiciones de medición, pero no tiene que estar dentro del intervalo de valores numéricos antes mencionado cuando se usa todos los métodos y condiciones de medición.

35 En el quitosano contenido en la composición acuosa de la presente invención, el grado de desacetilación de la quitina es preferiblemente aproximadamente del 50%.

40 El polietilenglicol de la presente invención incluye derivados convencionalmente conocidos, por ejemplo, polietilenglicoles ramificados y derivados terminados con una estructura reactiva de grupo amino tal como un aldehído, éster de hidroxisuccinimida o estructura éster del nitrobenzenosulfonato. El peso molecular del polietilenglicol es preferiblemente de 1000 a 20.000, y más preferiblemente de 1000 a 5000.

45 El término "polímero" significa una molécula que puede obtenerse a partir de monómeros que tienen un bajo peso molecular y tiene una estructura constituida por unidades monoméricas repetitivas. El término "macromolécula" significa una molécula gigante en la que una gran cantidad de átomos están unidos covalentemente, tal como proteínas y ácidos nucleicos.

50 Para los polímeros, el término "grado promedio de polimerización" significa el número promedio de unidades monoméricas contenidas en una molécula de polímero. Es decir, las moléculas de polímero de diferentes longitudes se dispersan en una composición de polímero en un cierto intervalo.

55 "Peso molecular promedio en número" con respecto al grado de polimerización de un polímero significa el promedio del peso molecular por molécula en una composición de polímero, y "peso molecular promedio en peso" significa el peso molecular calculado ponderando los pesos. Además, la relación entre el peso molecular promedio en peso y el peso molecular promedio en número se denomina dispersión, que sirve como una medida de la distribución del peso molecular en una composición de polímero. A medida que la dispersión se aproxima a 1, el grado promedio de polimerización en una composición polimérica se acerca, lo que significa que contiene muchas cadenas poliméricas de aproximadamente la misma longitud.

60 En el nanogel de la presente invención, también se pueden agregar aditivos según sea necesario dentro de un intervalo que no se desvíe del espíritu de la presente invención. Por ejemplo, se pueden usar aditivos tales como eliminadores de radicales, descomponedores de peróxido, antioxidantes, absorbentes UV, estabilizadores de calor, plastificantes, retardantes de llama, agentes antiestáticos, etc. Además, se pueden mezclar polímeros distintos del polímero de la presente invención. Dichas composiciones que contienen el nanogel biodegradable de la presente invención también son objeto de la presente invención.

65

El nanogel biodegradable de la presente invención puede usarse solo disolviéndolo en un disolvente orgánico apropiado, o puede usarse para diversas composiciones mezclándolo con otros compuestos macromoleculares de acuerdo con el propósito de uso pretendido. El dispositivo médico de la presente invención debe tener el nanogel biodegradable de la presente invención al menos en una parte de la superficie de la misma que se usa mientras está en contacto con tejido o sangre *in vivo*. Es decir, una composición que contiene el nanogel biodegradable de la presente invención puede usarse como un agente de tratamiento de superficie en una superficie de un sustrato que constituye un dispositivo médico. Además, al menos una parte del dispositivo médico puede estar constituido por el nanogel biodegradable o una composición del mismo.

Una realización de la presente invención es el nanogel biodegradable de la presente invención para suprimir una reacción de cuerpo extraño en sangre o tejido, cuando el nanogel se usa mientras está en contacto con tejido o sangre *in vivo* antes de descomponerse.

El nanogel biodegradable de la presente invención puede usarse preferiblemente en aplicaciones médicas. Cuando el nanogel biodegradable de la presente invención se usa como una composición mezclándolo con otro compuesto macromolecular, etc., se puede usar en una proporción de mezcla apropiada de acuerdo con el propósito de uso del mismo. En particular, se puede formar una composición que tenga características reforzadas de la presente invención ajustando la proporción del nanogel biodegradable de la presente invención a al menos 90% en peso. Además, se puede formar una composición que tenga más características de la presente invención ajustando la proporción del nanogel biodegradable de la presente invención entre 50 y 70% en peso, dependiendo de la aplicación.

Una realización de la presente invención es un dispositivo médico que contiene el nanogel biodegradable de la presente invención. En el presente documento, "dispositivo médico" incluye dispositivos implantados, tales como prótesis, así como dispositivos que pueden entrar temporalmente en contacto con tejidos corporales, tales como catéteres, y no se limita a dispositivos utilizados dentro del cuerpo. Además, el dispositivo médico de la presente invención es un dispositivo que se usa en aplicaciones médicas y tiene la composición polimérica de la presente invención en al menos una parte de su superficie. La superficie de un dispositivo médico mencionado en la presente invención significa, por ejemplo, la superficie del material que constituye el dispositivo médico que entra en contacto con la sangre etc., cuando se usa el dispositivo médico, y las porciones superficiales de poros en el material etc.

En la presente invención, el material y la forma del sustrato que constituye el dispositivo médico no está particularmente limitado, y puede ser, por ejemplo, un cuerpo poroso, fibra, tela no tejida, gránulos, película, lámina, tubo, fibra hueca, polvo, etc. Los ejemplos de este material incluyen macromoléculas naturales como el lino y macromoléculas sintéticas como el nailon, poliéster, poliacrilonitrilo, poliolefina, poliolefina halogenada, poliuretano, poliamida, policarbonato, polisulfona, polietersulfona, poli(met)acrilato, copolímero de etileno-alcohol vinílico y copolímero de butadieno-acrilonitrilo, y sus mezclas. Otros ejemplos incluyen metales, cerámicas y sus compuestos. Independientemente de si está construido a partir de una pluralidad de sustratos, es deseable que el nanogel biodegradable de la presente invención se proporcione en al menos una parte de la superficie del mismo que entra en contacto con la sangre, y preferiblemente sustancialmente toda la superficie que entra en contacto con la sangre.

El nanogel biodegradable de la presente invención puede usarse como un material que constituye el dispositivo médico completo usado mientras está en contacto con tejido o sangre *in vivo*, o un material que constituye la porción superficial del mismo. Los ejemplos de dispositivos médicos utilizados mientras están en contacto con tejido o sangre *in vivo* incluyen prótesis implantadas internamente o instrumentos terapéuticos, órganos artificiales de tipo circulación extracorpórea, hilo de sutura quirúrgica, así como catéteres (catéteres para órganos circulatorios tales como catéteres de imágenes vasculares, cables de guía y catéteres de PTCA; catéteres para órganos digestivos tales como catéteres gástricos, catéteres gastrointestinales y catéteres esofágicos; y catéteres urológicos tales como tubos, catéteres uretrales y catéteres ureterales). Además, utilizando su biodegradabilidad, el nanogel biodegradable de acuerdo con la presente invención se usa particularmente preferiblemente en dispositivos médicos que permanecen dentro del cuerpo durante la terapia.

El nanogel biodegradable de la presente invención puede usarse en un material de matriz para un agente hemostático, un material adhesivo de tejido corporal, un material de reparación para la regeneración de tejido, un portador de un sistema de liberación sostenida de fármaco, un órgano artificial híbrido tal como un páncreas o hígado artificial, un vaso sanguíneo artificial, un material trombótico o un andamio para ingeniería celular.

En estos dispositivos médicos, la lubricidad de la superficie puede proporcionarse adicionalmente para que la inserción en vasos sanguíneos o tejidos no dañe fácilmente el tejido. Un método excelente para proporcionar lubricidad superficial es insolubilizar una macromolécula acuosa y formar una capa de gel hidrófilo en la superficie del material. Este método puede proporcionar una superficie de material que tenga tanto biocompatibilidad como lubricidad superficial.

El nanogel biodegradable de la presente invención es en sí mismo un material que tiene una excelente biocompatibilidad, pero dado que también se puede encapsular una variedad de sustancias bioactivas, se puede usar en una diversidad de dispositivos médicos que incluyen no solo filtros para sangre sino también recipientes para conservación de sangre, circuitos sanguíneos, agujas permanentes, catéteres, alambres guía, cánulas intraluminales,

equipos de pulmón artificial, equipos de diálisis, endoscopios, etc.

Específicamente, el nanogel biodegradable de la presente invención puede recubrir al menos parcialmente una superficie de sustrato que constituye un filtro de sangre. Además, el compuesto macromolecular de la presente invención puede recubrir al menos una porción de una bolsa de sangre y la superficie en contacto con la sangre de un tubo que se conecta a la bolsa de sangre. El nanogel biodegradable de la presente invención también puede recubrir al menos una parte de la superficie de contacto con la sangre de un circuito sanguíneo de circulación extracorpórea constituido por un circuito sanguíneo del lado del campo operativo que consiste en un tubo, un filtro arterial, una bomba centrífuga, un hemoconcentrador, y un medio de cardioplegia.

El nanogel biodegradable de la presente invención también puede recubrir al menos una porción de la superficie de contacto con la sangre de un montaje de aguja permanente que contiene una aguja interna que tiene una punta afilada, un núcleo interno de aguja provisto en el lado proximal de la aguja interna, una aguja externa hueca en la que se puede insertar la aguja interna, un protector que se ajusta a la aguja interna y puede moverse en la dirección axial de la aguja interna, y un medio de conexión que conecta el cubo de la aguja externa y el protector. El nanogel biodegradable de la presente invención también puede recubrir al menos una porción de la superficie en contacto con la sangre de un catéter constituido por un tubo largo y un adaptador conectado en el extremo proximal (el lado cercano) del mismo.

El nanogel biodegradable de la presente invención también puede recubrir al menos una parte de la superficie de contacto de la sangre de un cable guía. El nanogel biodegradable de la presente invención también puede recubrir al menos una parte de la superficie en contacto con la sangre de las cánulas intraluminales de diversas formas, tales como una cánula intraluminal provista de poros en la superficie lateral de un cuerpo tubular hueco hecho de un material metálico o material macromolecular, o una cánula intraluminal hecha trenzando fibras hechas de material macromolecular o un cable hecho de material metálico y moldeado en una forma cilíndrica redonda.

El nanogel biodegradable de la presente invención también puede revestir la superficie exterior o la capa de la superficie exterior de una membrana de fibra hueca de un tipo de perfusión sanguínea exterior de membrana de fibra hueca de pulmón artificial del tipo en el que una pluralidad de membranas de fibra hueca porosa de intercambio gaseoso se mantienen en una carcasa y la sangre fluye hacia el lado de la superficie exterior de la membrana de fibra hueca mientras que el gas que contiene oxígeno fluye hacia el lado interior de la membrana de fibra hueca.

El nanogel biodegradable de la presente invención también puede recubrir al menos una parte de la superficie en contacto de sangre de un dispositivo de diálisis que tiene un circuito de sangre dializada que incluye al menos un recipiente de drenaje de sangre que recoge sangre dializada, y un medio de alimentación de sangre que alimenta sangre dializada y tiene el contenedor de sangre dializada como punto de partida y tiene el contenedor de drenaje de sangre como punto final.

[Ejemplo 1]

La presente invención se describirá con más detalle a continuación citando ejemplos, pero la presente invención no se limita a estos ejemplos. A menos que se indique lo contrario, el medicamento utilizado en los siguientes ejemplos es un producto disponible comercialmente utilizado en un estado inalterado. En los siguientes ejemplos, la distribución de peso molecular del polímero obtenido en cada ejemplo se midió de la siguiente manera.

Peso molecular promedio en número ($[M_n]$, unidades: g/mol)

Mediante el uso de poliestireno estándar de peso molecular máximo conocido, se midieron el peso molecular promedio en número (M_n) y el peso molecular promedio en peso del polímero usando cromatografía de permeación en gel (GPC) ("TOSO HLC-8320GPC" fabricado por Toso Corporation; estructura de la columna: guarda columna TSK SuperMP (HZ)-M, TSKgel SuperMultiporeHZ-M, cuatro columnas en serie) corregida por el poliestireno estándar (Disolvente: THF, temperatura: 40 °C, caudal: 0,35 mL/min).

Distribución del peso molecular ($[M_w/M_n]$)

Usando los valores de peso molecular promedio en peso (M_w) y peso molecular promedio en número (M_n) determinados por el método anterior, la distribución de peso molecular se determinó como la relación de los mismos (M_w/M_n).

Medición de RMN

Para el análisis estructural del polímero, se llevaron a cabo mediciones de RMN de ^1H y RMN de ^{13}C usando un dispositivo de medición de RMN (fabricado por Bruker; 400 MHz). Obsérvese que se usó CDCl_3 ^1H : 7,26 ppm, ^{13}C : 77,1 ppm) como el estándar para el desplazamiento químico.

Síntesis de poli(etilenglicol) terminado en un solo aldehído (CHO-PEG-OH)

Se disolvió α-acetal-ω-hidroxiolil-PEG (Mn = 5.300.545 mg) en 2,5 mL de THF, y luego se añadieron 2,5 mL de HCl 1 N, y esto se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se lavó con agua y se extrajo con cloroformo, se lavó con solución salina saturada, y se deshidrató con sulfato de sodio y luego se precipitó con éter dietílico. Por liofilización con benceno, se obtuvo un sólido blanco (CHO-PEG-OH) (rendimiento: 422 mg (77%), RMN de ¹H- (400 MHz, cloroformo-d, pico estándar: parte subrayada) δ : 9,78-9,83 (2), 3,54-3,80 (1)).

Síntesis de quitosano injertado con PEG (PEG-g-CS)

Quitosano (CS (Koyo Chemical Co., Ltd., DAC50, lote 981028, Mw = 234.000, Mn = 93.000, Mw/Mn = 2,5, grado de desacetilación = 54%), 80 mg, grupos amino $2,38 \times 10^{-4}$ mol [cantidad de grupos amino por masa calculada a partir del grado de desacetilación]) se disolvió en 8 mL de agua Milli-Q, y luego el pH se ajustó a 6,5 añadiendo aproximadamente 350 µL de NaOH 0,1 N. A esto, se le agregó CHO-PEG-OH en polvo (410 mg, grupos aldehído $4,76 \times 10^{-5}$ mol [calculado a partir de la tasa de aldehidación del 60%]), 0,2 eq. frente a grupos amino en CS), y esto se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Luego, se añadió cianoborohidruro de sodio (29 mg, 10 eq. frente a grupos aldehído), y esto se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La solución obtenida se dializó durante 1 día con respecto al agua (fracción de peso molecular: 12.000 a 14.000), y mediante liofilización, se obtuvo un sólido blanco (PEG-g-CS) (rendimiento: 435 mg (89%), RMN de ¹H (400 MHz, óxido de deuterio, pico estándar: parte subrayada) δ: 2,83-3,00 (1), 2,67-2,82 (2)).

Obsérvese que cuando se usó quitosano (Koyo Chemical Co., Ltd., DAC50HCl, lote 107311, Mw = 1.046.000, Mn = 157.000, Mw/Mn = 6.7, grado de desacetilación = 47%), el nanogel fue difícil de formar.

Síntesis de quitosano injertado con PEG y RADA (PEG/RADA-g-CS)

Se disolvieron 50 mg de PEG-g-CS (grupos amino residuales $1,87 \times 10^{-5}$ mol) en 10 mL de agua Milli-Q. A esto se le añadieron aproximadamente 35 µL de NaOH 0,1 N, para ajustar el pH de la solución a 7,43. Se añadió una solución de DMSO seca preparada por separado de 6-maleimidohexanoato de N-succinimidilo (HL: enlazador hetero) (12,0 mg, $3,74 \times 10^{-5}$ mol, 2,0 eq. vs. grupos amino en CS), y esto se agitó durante 3 h a temperatura ambiente (PEG/HL-g-CS). Después de agitar, se purificó por diálisis durante 4 h en agua Milli-Q usando una membrana de diálisis (fracción de peso molecular de 12.000 a 14.000). Para el análisis estructural, se recogió una porción de la muestra como un polvo mediante liofilización. La velocidad de modificación de maleimida se midió por RMN de ¹H (400 MHz, óxido de deuterio, pico estándar: parte subrayada) δ: 6,94-7,04 (3), 2,86-3,02 (1), 2,75 -2,86 (2)).

[Tabla 1]

▪ Síntesis de PEG/RADA-g-CS

Quitosano

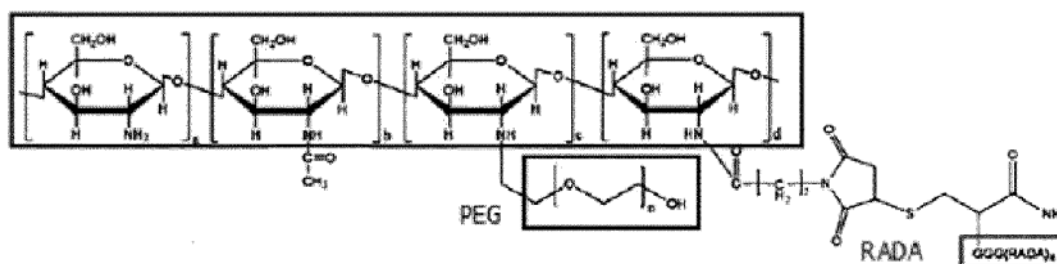


Tabla. Grado injertado de PEG, HL y RADA al grupo amino de CS

	Grado injertado/%		
	PEG ^{a)}	HL ^{a)}	RADA16 ^{b)}
PEG/RADA-g-CS ^{c)}	12	40	35

^{a)} Calculado por RMN de ¹H. ^{b)} Estimado por micro ensayo BCA.

^{c)} El grado de desacetilación de CS es 54%.

Esta es la estructura del PEG/RADA-g-CS. El "grado injertado" indica la proporción de modificación de PEG y RADA con respecto a los grupos amino en el quitosano. En el presente documento, la cantidad de grupos amino en el quitosano se define en función del grado de acetilación. Es decir, teniendo en cuenta que la desacetilación, es del 54% cuando se modifican todos los grupos amino.

El PEG se calculó a partir del análisis de RMN de ¹H. HL (enlazador hetero) es una abreviatura de 6-maleimidohexanoato de N-succinimidilo. Es una molécula de bajo peso molecular para modificar grupos maleimida en el marco de quitosano. La velocidad de modificación del grupo maleimida también se calculó a partir del análisis de RMN de ¹H. Luego, el quitosano se modificó con RADAGGGC por reacción con grupos maleimida, tomando como objetivo la cisteína de RADAGGGC. Se usó un ensayo de micro BCA en el análisis cuantitativo después de la modificación de RADA.

Luego, la solución de la muestra se diluyó hasta un total de 100 mL (concentración final de disolvente: PBS 15 mM) y 100 mL de solución acuosa de RADAGGC (se añadieron 100 mL de 0,24 mg/mL: 24 mg, 1,2 eq. frente a grupos maleimida en CS) y se agitó a temperatura ambiente durante 16 h (pH cuando se agitó: 6,75). Después de agitar, se purificó por diálisis en agua Milli-Q durante 2 días usando una membrana de diálisis (fracción de peso molecular de 12.000 a 14.000). Después de la diálisis, se obtuvo un sólido blanco por liofilización (PEG/RADA-g-CS). Solo se recolectó la cantidad requerida para el análisis de IR a partir de la muestra seca de PEG/RADA-g-CS. La velocidad de modificación de RADA se estimó a partir de la medición del peso del péptido por unidad de peso de la muestra utilizando un ensayo de micro BCA. Se usaron soluciones acuosas de PEG/RADA-g-CS concentradas a concentraciones objetivo en experimentos posteriores.

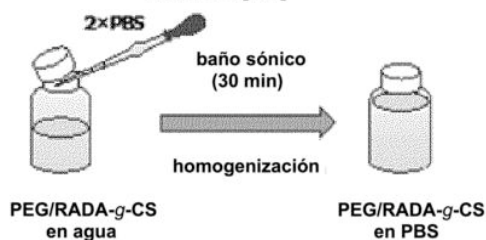
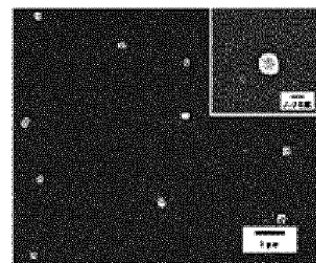
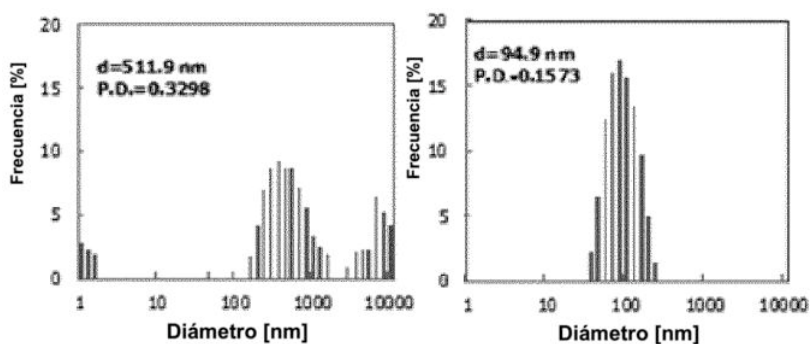
La evaluación del comportamiento de agregación de PEG/RADA-g-CS se muestra en la Tabla 2.

[Tabla 2]

- 15 Evaluación del comportamiento de agregación de PEG/RADA-g-CS

[Medición por DLS]

[Observación por SEM]



- Con PG-g-CS, el agregado se formó primero modificando RADA sin medir la intensidad de dispersión
- De acuerdo con la medición del tamaño de partícula por DLS y la observación por SEM, se obtuvieron agregados relativamente monodispersos de alrededor de 100 nm de diámetro
- Se sugirió que la estructura de lámina β en los agregados se destruyó temporalmente y se volvió a agregar uniformemente mediante la aplicación de ondas ultrasónicas.

Se sugirió la formación de agregados con base en la organización de RADA

- 20 La medición del espectro de CD reveló un efecto de algodón negativo que se origina a partir de la estructura de lámina β de RADA en el PEG/RADA-g-CS (Tabla 3). La medición de fluorescencia también reveló la formación de una estructura de lámina β de RADA en el PEG/RADA-g-CS (Tabla 3).

[Tabla 3]

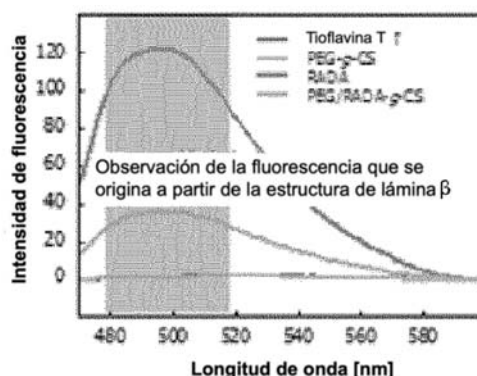
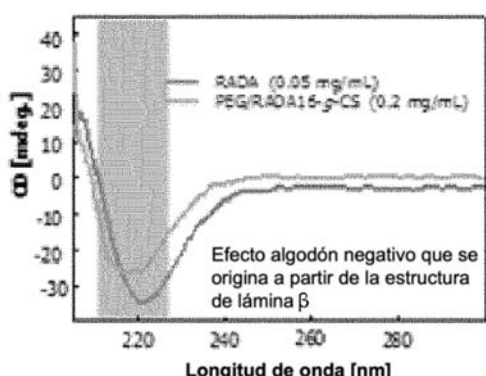
- 25 Evaluación de la estructura de lámina β en PEG/RADA-g-CS

[medición del espectro de CD]

[Medición de fluorescencia por tioflavina T]

RADA 16 : 0,05 mg/mL en PBS
 PEG/RADA 16-g-CS : 0,2 mg/mL en PBS

Concentración final de tioflavina T : 50 µM, longitud de onda de excitación: 460 nm
 PEG-g-CS, RADA, PEG/RADA-g-CS: cada uno 1 mg/mL en PBS



- A partir de la medición del espectro de CD, se observó un efecto algodón negativo que se origina a partir de la estructura de lámina β de RADA en PEG/RADA 16-g-CS
- A partir de la medición de fluorescencia usando también tioflavina T, se determinó la formación de una estructura de lámina β en PEG/RADA-g-CS

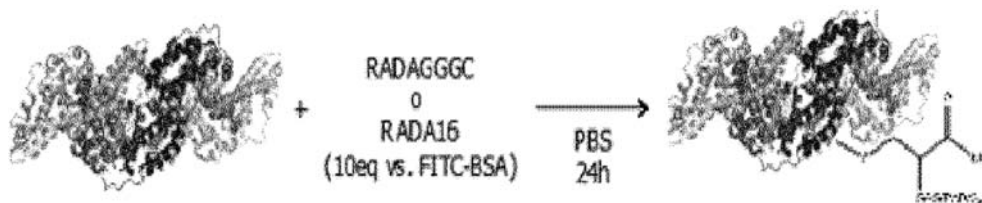
Evaluación de encapsulación y liberación de FITC-BSA por agregado de PEG/RADA-g-CS

5 El FITC-BSA tiene 66 kDa y tiene 35 residuos de Cys en su estructura, de los cuales 34 residuos de Cys forman -S-S-

10 Se añadió una solución acuosa Milli-Q de RADAGGC (0,5 mL, 1, 5, 10 equivalentes frente a FITC-BSA) a FITC-BSA (0,5 mg/mL en 2X PBS, 2,0 mL), y esto fue agitado a temperatura ambiente en un lugar oscuro durante 16 h. En este momento, dado que la concentración de FITC-BSA en la solución se había convertido en 0,4 mg/mL, se usó para muestras de FITC-BSA previamente recubiertas con RADAGGC sin una operación de purificación para eliminar RADAGGC sin reaccionar. A modo de comparación, RADA16 sin modificación final se mezcló y agitó con FITC-BSA usando la misma relación de peso y operaciones (Tabla 4).

[Tabla 4]

- Evaluación del comportamiento de encapsulación y liberación de FITC-BSA en agregado de PEG/RADA-g-CS



* FITC-BSA: 66 kDa, que contiene 35 residuos de Cys en la estructura, de los cuales 34 forman -S-S-

* Relación de FITC-BSA:RADA = 10:3

(peso)

Operación de purificación no realizada

[Muestra de FITC-BSA]

Para mejorar la capacidad de agregación en el núcleo de FITC-BSA, se mezclaron FITC-BSA y RADA antes de la mezcla con PEG/RADA-g-CS

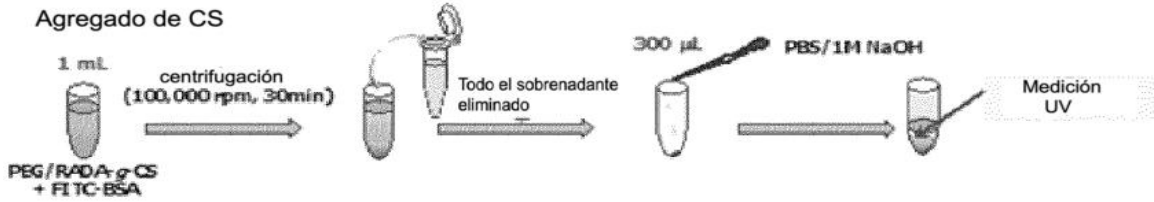
nombre de la muestra	concentración de FITC-BSA [mg/mL]	estado del FITC-BSA
Libre		FITC-BSA mezclada con nada
RADA	0,4	Mezclada con RADA16
GGGC		Mezclada con RADAGGC

15 FITC-BSA recubierto previamente con RADA se preparó mediante las operaciones anteriores. Se prepararon dos muestras, incluida una muestra físicamente recubierta con FITC-BSA usando RADA16, y una muestra dirigida a la unión de disulfuro con los residuos de Cys presentes en FITC-BSA (modificación química de FITC-BSA) usando RADAGGC. FITC-BSA contiene 35 residuos de Cys por molécula, entre los cuales uno es Cys libre que no está involucrado en el enlace disulfuro intramolecular. Por lo tanto, se agregó RADAGGC, dirigido a la formación de enlaces disulfuro con ese Cys. No se ha confirmado que RADAGGC pueda modificar químicamente FITC-BSA mediante esta técnica de recubrimiento previo con RADA, pero el efecto del recubrimiento previo con RADA se evaluó mediante pruebas de encapsulación y liberación posteriores y pruebas de estabilidad estructural (Tabla 5, Tabla 6, Figuras 1 a 4)

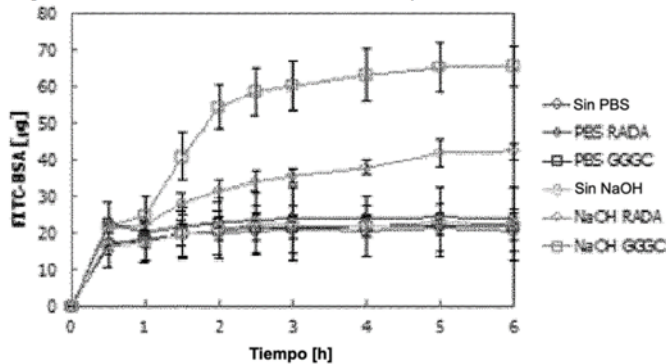
20

[Tabla 5]

- Evaluación del comportamiento de encapsulación y liberación de FITC-BSA en agregado de PEG/RADA-g-CS
Agregado de CS



[Resultados de la medición del comportamiento de liberación]



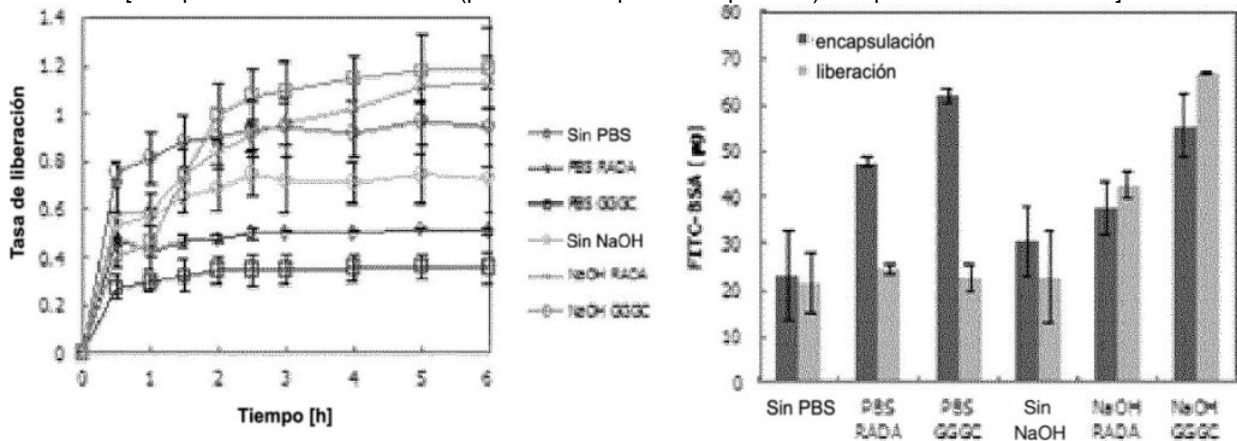
- En PBS, en el que no se observa la desintegración del agregado, se liberó una cierta cantidad de FITC-BSA, después de lo cual no se observó liberación adicional
- En NaOH, en el que se sugiere desintegración del agregado, se liberó gradualmente hasta por 6 horas

5

[Tabla 6]

- Evaluación del comportamiento de encapsulación y liberación de FITC-BSA en el agregado de PEG/RADA-g-CS

[Comportamiento de liberación (peso liberado/peso encapsulado) · equilibrio de la sustancia]



10

- El peso encapsulado en el agregado se mejoró mezclando previamente RADA16, RADAGGGC con FITC-BSA
- En el sistema en el que se midió el comportamiento de liberación a PBS, el peso liberado se mantuvo constante independientemente del peso encapsulado
- En el sistema en el que se midió el comportamiento de liberación a NaOH, se cree que el peso encapsulado total se liberó a medida que el agregado se desintegraba

15

El peso encapsulado de FITC-BSA en el agregado puede mejorarse mezclando con RADA.

Se sugiere que podría resultar en un portador que libera FITC-BSA a medida que el agregado se desintegra.

20

La función de reconocimiento molecular a través de la modificación con RADA se evaluó usando un ensayo de ELISA. Estos son los resultados de la medición de ELISA utilizando albúmina no tratada como control. En el tratamiento con albúmina con RADA16 o RADAGGGC, los resultados de la medición de ELISA fueron aproximadamente los mismos que los del control. Por lo tanto, el revestimiento previo con RADA se logró sin variación estructural de la proteína, y la encapsulación sin variación estructural de la proteína también se logró en la encapsulación de nanogel utilizando esta técnica (Figuras 5, 6).

25

Evaluación de la encapsulación y liberación de FITC-lisozima por el agregado de PEG/RADA-g-CS

Síntesis de FITC-lisozima (Robeson, J. L. et al., Langmuir. 1996, 12, 6104-6113, Takano, M. et al., Eur. J. Pharmacol. 2004, 502, 149-155)

5 Primero, se disolvieron 50 mg ($3,57 \times 10^{-6}$ mol) de lisozima en 30 mL de tampón de borato 100 mM de pH 9,2 (pH ajustado mediante la adición de NaOH 1 M a una solución de ácido bórico (concentración final de ácido bórico) = 100 mM)). A esto se añadieron 550 μ L de solución acuosa de 1,0 mg/mL de FITC ($1,41 \times 10^{-6}$ mol, 0,55 mg, 0,4 equivalentes como equivalentes molares frente a lisozima), y esto se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Luego, después de la diálisis durante 2 días en PBS, se determinó mediante la medición del espectro UV sin realizar un intercambio de disolvente durante la noche (diálisis total durante 3 días) que no se observó absorción originada por FITC en la solución externa de la membrana de diálisis. Una vez completada la diálisis, la filtración se realizó usando un filtro de jeringa con un diámetro de poro de 1,0 μ m para eliminar la materia insolubilizada de la solución interna de la membrana de diálisis. Después de la filtración, se midieron las concentraciones respectivas de FITC y lisozima (véase más abajo para más detalles), y la solución recuperada se diluyó usando PBS hasta 0,5 mg/mL, que es la concentración que se utilizó.

Determinación de concentraciones de compuestos en FITC-lisozima

20 Para la medición de FITC, se empleó la medición de absorbancia de luz porque la intensidad de fluorescencia varía mucho y la capacidad de medición es pobre dependiendo del tiempo transcurrido y el tipo de disolvente.

(A) Medición de FITC en FITC-lisozima - Medición del espectro UV

25 1. Para medir FITC, se midieron los espectros UV de las soluciones en PBS de FITC [0/5/10/25/50 ($\times 10^{-6}$ M)], y se creó una curva de calibración a partir de la absorbancia a 495 nm.
2. El espectro UV se midió para una muestra diluida 10 veces con PBS, de modo que la absorbancia de la solución de la muestra estaba en un intervalo medible.
3. Usando la curva de calibración creada en la etapa 1, se calculó la concentración de FITC en la solución de la muestra a partir de la absorbancia a 495 nm de la solución de la muestra.

(B) Medición de lisozima en FITC-lisozima - Ensayo BCA

35 1. Para una curva de calibración, se prepararon soluciones en PBS de lisozima [0/0,25/0,50/0,75/1,0/1,5/2,0 (mg/mL)].
2. Para determinar que FITC no es una sustancia dañina para el ensayo BCA, se prepararon soluciones en PBS de FITC [0/10/25/50/100 (μ g/mL)].
3. Los ensayos de BCA de las soluciones de la curva de calibración y las soluciones de las muestras preparadas en las etapas 1 y 2 anteriores se realizaron de acuerdo con el procedimiento del fabricante del kit.

(C) Determinación de las concentraciones respectivas de FITC y lisozima

40 1. Para FITC, la concentración de FITC en la solución de la muestra se calculó utilizando la curva de calibración de la absorbancia a 495 nm de la solución de la muestra obtenida en el experimento (A).
2. Para la lisozima, debido a que se encontró en el experimento (B) que FITC reacciona en el ensayo BCA, la concentración de lisozima se determinó a partir de una curva de calibración de lisozima después de restar, como fondo, la absorbancia equivalente a la concentración de FITC calculada en el experimento (A) en la curva de calibración de FITC del experimento (B).

Evaluación de la estabilidad estructural de FITC-lisozima

50 Mediante las operaciones anteriores, se midieron los espectros de CD para la solución de la muestra mediante las cuales se calculó la concentración de lisozima y una solución de lisozima no modificada con FITC (en esta medición, la concentración de lisozima se ajustó a 0,05 mg/mL).

Condiciones de medición del espectro de CD

55 Longitud de onda inicial: 300 nm
Longitud de onda final: 205 nm
Número de aproximaciones: 3
Intervalo de datos: 0,5 nm
Respuesta: 1 segundo
60 Ancho de banda: 1.0 nm
Longitud del paso de luz: 1 cm.
Sensibilidad: 50 milésima de grado
Sensibilidad de operación: 200 nm/min

65 Los resultados de medir cada compuesto en la solución de la muestra se muestran en la Tabla 7 y la Figura 6)

[Tabla 7]

Condiciones de modificación	Nombre del compuesto	Concentración [mol/L]	Cantidad de disolvente [mL]	Masa [mg]	Rendimiento [%]	Velocidad de modificación [mol/mol lisozima]
pH 9,2	Lisozima	$6,47 \times 10^5$	30	27,2	54	0,90
	FITC	$5,83 \times 10^5$		0,68	123	

5 Cuando se midieron los espectros de CD después de emparejar las concentraciones de lisozima de la FITC- lisozima sintetizada y la lisozima nativa, se determinó la concordancia de las formas de onda y de las intensidades de los espectros. Por lo tanto, se cree que la FITC-lisozima sintetizada en este experimento no fue desnaturalizada por modificación del FITC.

10 La encapsulación y la liberación de la FITC-lisozima sintetizada en un agregado se evaluó usando la curva de calibración de la absorbancia de FITC.

Recubrimiento previo con RADA de FITC-lisozima

FITC-lisozima tiene 14 kDa y tiene 8 residuos de Cys en su estructura, todos los cuales forman -S = S-.

15 Se añadió RADAGGGC (solución acuosa Milli-Q, 0,5 mL, 1, 5, 10 equivalentes frente a FITC-lisozima) a la FITC-lisozima (0,5 mg/mL en PBS 2X, 2,0 mL), y esto se agitó. a temperatura ambiente en un lugar oscuro durante 16 h. En este momento, dado que la concentración de FITC-lisozima en la solución se había convertido en 0,4 mg/mL, se usó para muestras de FITC-lisozima previamente recubiertas con RADAGGGC sin una operación de purificación para eliminar RADAGGGC sin reaccionar. A modo de comparación, RADA16 sin modificación final se mezcló y se agitó con FITC-lisozima usando la misma relación de peso y operaciones.

20 La concentración de la solución acuosa de RADA y las condiciones utilizadas en el recubrimiento previo se muestran a continuación.

[Tabla 8]

Equivalentes agregados *[X eq. Frente a 1 mol de FITC-lisozima]	Concentración de la solución acuosa de RADA [mg/mL]	Concentración de disolvente en el recubrimiento previo	Relación en peso con respecto a FITC-lisozima [FITC-lisozima: RADA = 1:X]
10	3,0	1,6X PBS	1,5
5	1,5		0,75
1	0,3		0,15

* "Equivalentes agregados" significa el peso molar agregado de RADA en relación con 1 mol de lisozima.

30 FITC-lisozima previamente recubierta con RADA se preparó mediante las operaciones anteriores. Se prepararon dos muestras, incluida una muestra recubierta físicamente con FITC-lisozima utilizando RADA16, y una muestra dirigida a la unión de disulfuro con los residuos de Cys presentes en FITC-lisozima (modificación química de FITC-lisozima) mediante el uso de RADAGGGC. Debido a que FITC-lisozima contiene 8 residuos de Cys por molécula y todos ellos están involucrados en la unión disulfuro intramolecular, no hay Cys libre, pero el recubrimiento previo se realizó dirigido a la unión de RADAGGGC con lisozima mediante una reacción de intercambio a través de tiol en los residuos de Cys que forman enlaces disulfuro. Al igual que FITC-BSA, no se ha confirmado que RADAGGGC pueda modificar químicamente la lisozima mediante esta técnica de recubrimiento previo con RADA, pero la importancia del recubrimiento previo con RADA y la lisozima de la misma se evaluaron mediante pruebas de encapsulación y liberación posteriores y pruebas de actividad bacteriolítica.

1. La concentración de una solución acuosa Milli-Q de PEG/RADA-g-CS se ajustó a 2,0 mg/mL.

40 2. FITC-BSA previamente recubierto con RADA16 o RADAGGGC (cantidad equivalente de recubrimiento previo con RADA: 1, 5, 10 equivalentes frente a FITC-lisozima) y FITC-lisozima no recubierta previamente se ajustaron de modo que la concentración de FITC-lisozima fuera de 0,4 mg/mL (concentración final del disolvente: 1,6X PBS).

3. Las soluciones de las etapas 1 y 2 anteriores se agregaron a microtubos en cantidades iguales de 750 µL cada una y se mezclaron, y se sometieron a ultrasonido usando un baño sonicador durante 30 minutos. (Concentración cuando se encapsuló: PEG/RADA-g-CS: 1,0 mg/mL, FITC-lisozima: 200 µg/mL)

45 4. Después de completar el tratamiento con ultrasonido, se centrifugó 1 mL de cada una de las soluciones a 100.000 rpm durante 30 minutos, se eliminó la solución sobrenadante y se fraccionó toda la cantidad.

5. Las muestras de sobrenadante se agregaron en una cantidad de 100 µL a placas de 96 pozos, y se midió la absorbancia usando un lector de microplacas. [Longitud de onda de medición: 494 nm]

50 6. Para medir el comportamiento de liberación de las tres muestras de FITC-lisozima no recubierta con RADA y FITC-lisozima previamente recubierta con 10 equivalentes de RADA16 o RADAGGGC, se añadieron 300 µL de PBS fresco o NaOH 1 M, que se sabe que acelera la desintegración de los agregados, a cada tubo de centrifuga.

7. La absorbancia de la FITC-lisozima liberada en el disolvente se midió a intervalos de tiempo fijos (se agregaron 100 µL a una placa de 96 pozos, y se midió la absorbancia a 494 nm, y después de la medición, la muestra usada de 100

µL se devolvió en su totalidad al tubo de centrifuga).
Los resultados se muestran en las Figuras 8 a 11.

5 Primero, se discutirá el peso encapsulado. En comparación con la FITC-lisozima no recubierta previamente con RADA, se observó una mejora en el peso encapsulado en las muestras previamente recubiertas con RADA. Además, se descubrió que esta lisozima con un peso encapsulado mejorado podría mejorarse aún más aumentando los equivalentes de RADA añadidos. Además, una comparación de los dos tipos de RADA reveló que el peso encapsulado mejoró mucho más en RADAGGC, en el que se sugirió la modificación química del enlace de disulfuro de la FITC-lisozima, que en RADA16, que recubre físicamente la FITC-lisozima. Se cree que este resultado se debe al hecho de
10 que se encapsuló eficientemente a través de la formación de la estructura de lámina β intermolecular en el núcleo de RADA del agregado PEG/RADA-g-CS mediante la técnica de recubrimiento previo de FITC-lisozima con RADA. Los resultados anteriores exhiben una tendencia similar a la de FITC-BSA realizada previamente, y sugieren que la técnica de recubrimiento previo con RADA es aplicable para mejorar el peso encapsulado de varias proteínas.

15 A continuación, se discutirá el peso de liberación. Al medir el comportamiento de liberación de la FITC-lisozima de un agregado en este experimento, se usaron dos tipos de disolventes, incluyendo PBS y NaOH 1 M, que se sabe que aceleran la desintegración del agregado. La fila superior muestra gráficos de la velocidad de liberación, tal como la relación del peso de liberación con respecto al peso encapsulado. La fila inferior muestra gráficos con el peso de la FITC-lisozima liberada en el eje vertical. Comparando los dos tipos de disolventes, no se midió sustancialmente la liberación de FITC-lisozima en PBS en la que no se observa desintegración del agregado, mientras que en condiciones básicas en las que se sugiere la desintegración del agregado, se liberó aproximadamente el 60% del peso encapsulado a medida que el agregado se desintegraba. Comparando la liberación de cada muestra en NaOH 1 M, se logró una liberación lenta en FITC-BSA previamente recubierta con RADA en comparación con BSA no modificada con RADA, y además, la lisozima fue más prominente en RADAGGC que en RADA16. Se cree que este es un resultado que se correlaciona con los resultados del peso encapsulado, en el que se cree que BSA se encapsula eficientemente en el núcleo agregado a través de la formación de la estructura de lámina β a través de las características autoorganizables de RADA.
20
25

30 Considerando el equilibrio de las sustancias encapsuladas y liberadas, aproximadamente el 80% del peso encapsulado se liberó en 6 horas en el sistema que usaba NaOH 1 M. En el sistema que usaba FITC-BSA, se liberó sustancialmente toda la cantidad en 6 horas. Por lo tanto, se cree que en este caso está involucrado algún tipo de enlace específico entre PEG/RADA-g-CS y la lisozima. Se sabe que, en general, el comportamiento de liberación de proteínas en geles a granel que usan RADA depende en gran medida del peso molecular de la proteína, y que realmente no se ve afectado por la carga eléctrica (Koutsopoulos, S. et al., PNAS. 2009, 106, 4623-4628, Hosseinkhani, H. et al., Chem. Rev.2013, 113, 4837-4861). Por esta razón, se creía que se obtendría un comportamiento de liberación más rápido con FITC-lisozima, que tiene un peso molecular más bajo que FITC-BSA, que con FITC-BSA. Sin embargo, en los resultados obtenidos en estos experimentos, la liberación en PBS se suprimió en gran medida incluso en la FITC-lisozima no recubierta previamente con RADA, que es diferente de las características exhibidas por el microgel de RADA. Debido a que este agregado contiene PEG y CS como elementos constitutivos además de RADA, se cree que tales resultados se obtuvieron debido a la unión específica de la lisozima a cualquiera de ellos, pero actualmente se están discutiendo e investigando detalles.
35
40

Evaluación funcional de la FITC-lisozima previamente recubierta con RADA

45 Preparación de la solución de *Micrococcus*

Usando 1X PBS*, se preparó una solución de *Micrococcus* (*Micrococcus lysodeikticus*, ATCC no. 4698) de 150 µg/mL. Se diluyó con PBS hasta una concentración final de 100 µg/mL, y se midió el espectro UV de la solución usando una celda con una longitud de paso de luz de 1 cm. Se comprobó que la absorbancia a 450 nm era de 0,6 a 0,7. En el análisis de la actividad bacteriolítica de la lisozima usando *Micrococcus*, se empleó una concentración final de 100 µg/mL.
50

* 1X PBS: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄·12H₂O 8,0 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM

55 Evaluación de la actividad bacteriolítica de la lisozima (Davies, R. C. et al., BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA 1968, 178, 294-503)

1. Se añadieron 666 µL de solución de *Micrococcus* (150 µg/mL) y 234 µL de 1X PBS a una celda negra con una longitud de paso de luz de 1 cm.
2. A esta se añadieron 100 µL de una muestra de lisozima preparada por separado. Téngase en cuenta que la muestra de lisozima previamente recubierta con péptido se preparó mezclando lisozima y la solución de péptido y luego reaccionando durante 16 h en un sitio oscuro, que luego se usó en la evaluación de la actividad bacteriolítica.
3. Después de agregar la muestra de lisozima, se pipeteó rápidamente 10 veces, inmediatamente después de lo cual se inició la medición y se monitorizó la absorbancia a 450 nm.
4. La tasa de disminución de la absorbancia a 450 nm durante 60 s después del inicio se calculó a partir de la pendiente de aproximación lineal, y esto se tomó como la actividad bacteriolítica de la lisozima.
5. La tasa de supervivencia de la actividad bacteriolítica de la lisozima debido al recubrimiento del péptido se calculó
60
65

comparando la actividad bacteriolítica de las muestras previamente recubiertas con péptido (las condiciones de recubrimiento previo incluyeron tres relaciones de lisozima: RADA o GGGC-RADA de 1:1, 1:10, 1:100), tomando la actividad de la lisozima libre de péptidos como 1. En el presente documento, el volumen total de muestra fue de 1000 μ L, y las concentraciones finales se estandarizaron a 100 μ g/mL para *Micrococcus* y 6 μ g/mL para lisozima.

La Figura 12 muestra la actividad bacteriolítica de la lisozima recubierta con péptido cuando la actividad bacteriolítica de la lisozima se toma como 1. Se comprobó que la inactividad de la lisozima se mantuvo estable mediante el recubrimiento previo con RADA16 o RADAGGGC. Este resultado sugiere que es posible encapsular estable y eficientemente una capa de péptido en una proteína en un nanogel mientras se mantiene la actividad de la proteína.

[Aplicabilidad industrial]

El nanogel de la presente invención es útil para el suministro de proteínas.

Listado de secuencias

<110> 3-D Matrix, Ltd.

<120> Síntesis de nano-ensamblaje de quitosano modificado con péptido autoensamblable y una aplicación del mismo para el suministro de proteínas

<130> FP3895PCT

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 1

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
1 5 10 15

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 2

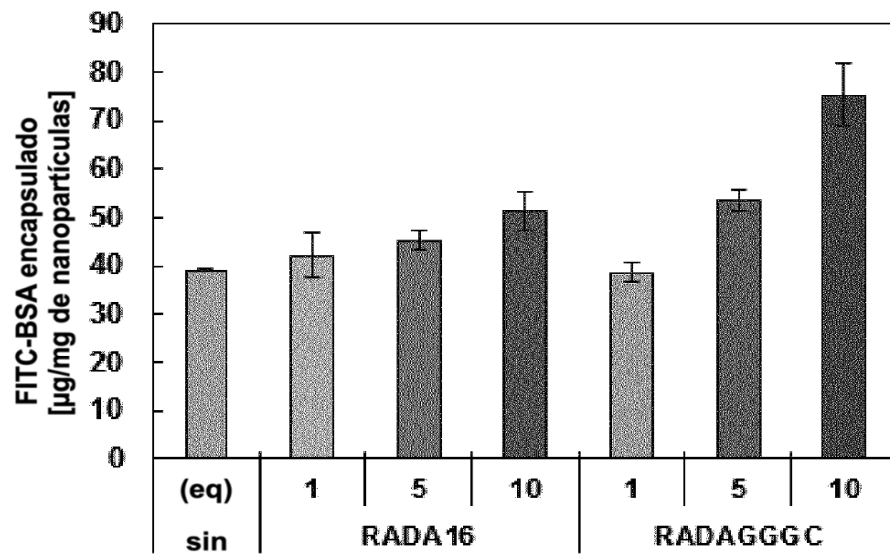
Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
1 5 10 15

Gly Gly Gly Cys
20

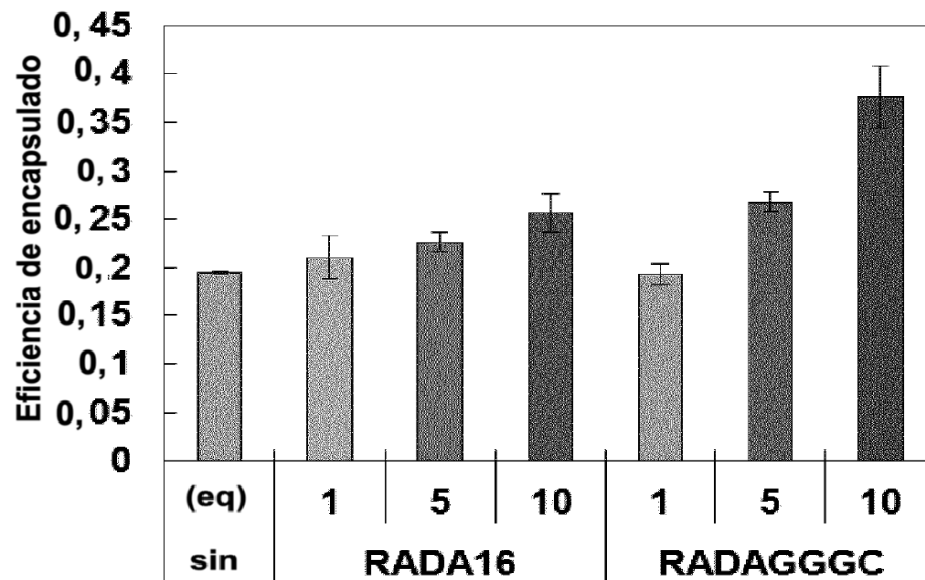
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un sistema de administración de fármacos que comprende una proteína y un nanogel que encapsula la proteína, comprendiendo el nanogel un péptido autoorganizable, un quitosano y polietilenglicol, en el que el péptido autoorganizable es RADARADARADARADAGGGC.
2. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el quitosano comprende quitina desacetilada.
- 10 3. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el quitosano comprende una β -1,4-poliglucosamina.
4. El sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el quitosano forma un derivado.
- 15 5. El sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el quitosano tiene un peso molecular promedio en peso entre 1000 y 1.000.000 g/mol.
6. El sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el quitosano tiene un peso molecular promedio en peso entre 10.000 y 300.000 g/mol.
- 20 7. El sistema de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el grado de desacetilación del quitosano es aproximadamente del 50%.
8. El sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el polietilenglicol forma un derivado.
- 25 9. El sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el polietilenglicol tiene un peso molecular entre 1000 y 20.000 g/mol.
10. El sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el polietilenglicol tiene un peso molecular entre 1000 y 5000 g/mol.
- 30 11. El sistema de administración de fármacos de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para uso como medicamento.

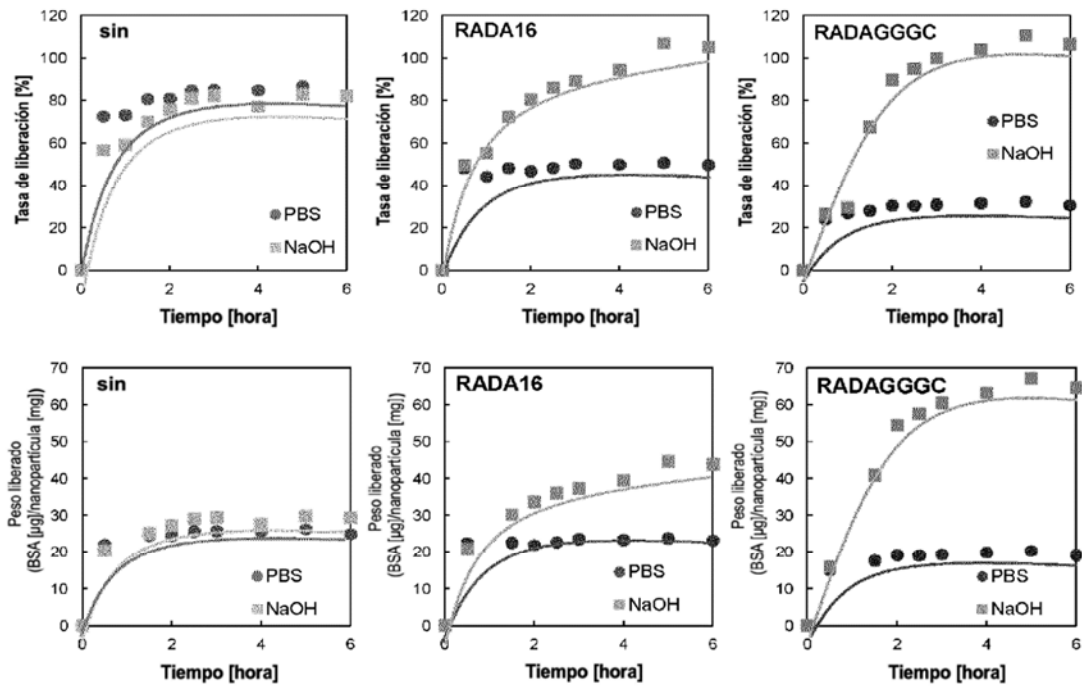
[FIG. 1]



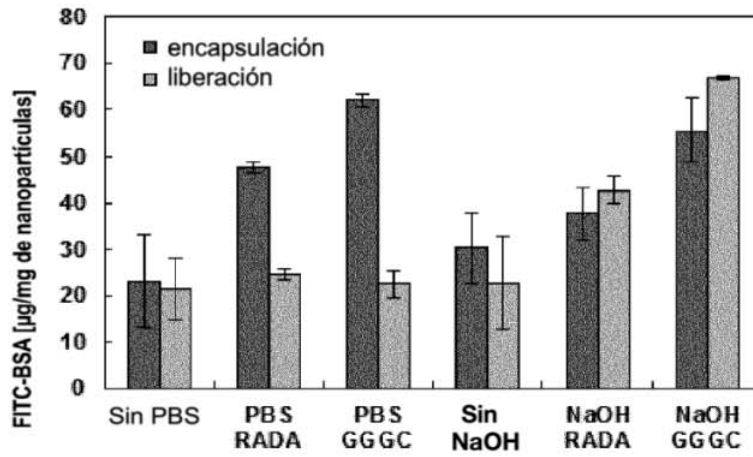
[FIG. 2]



[FIG. 3]

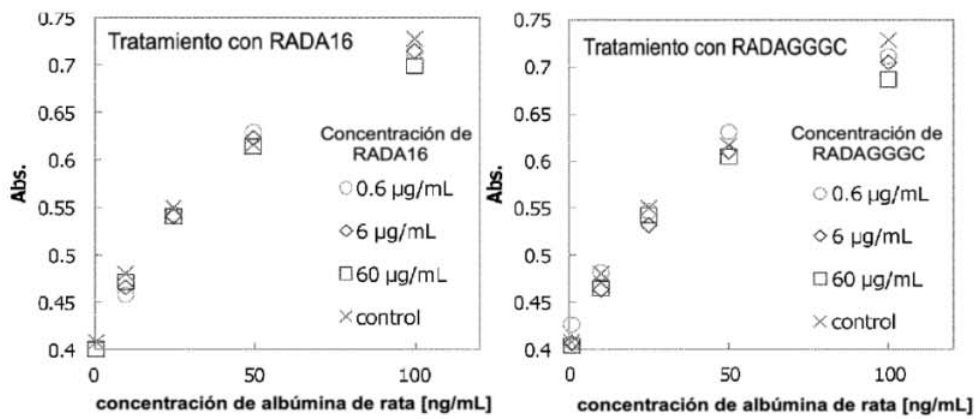


[FIG. 4]

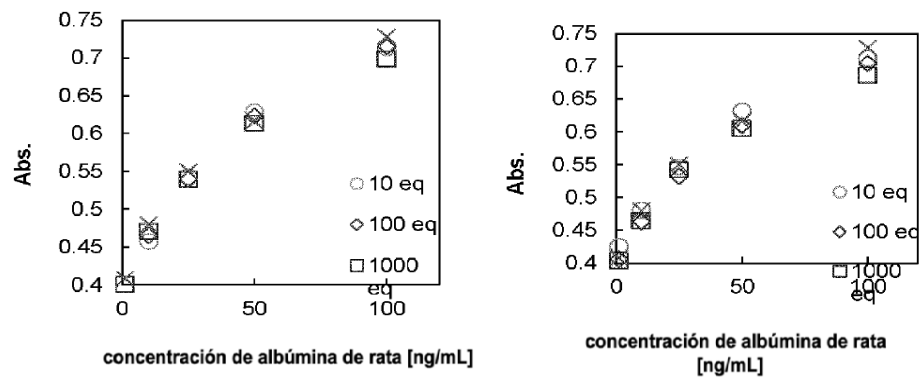


[FIG. 5]

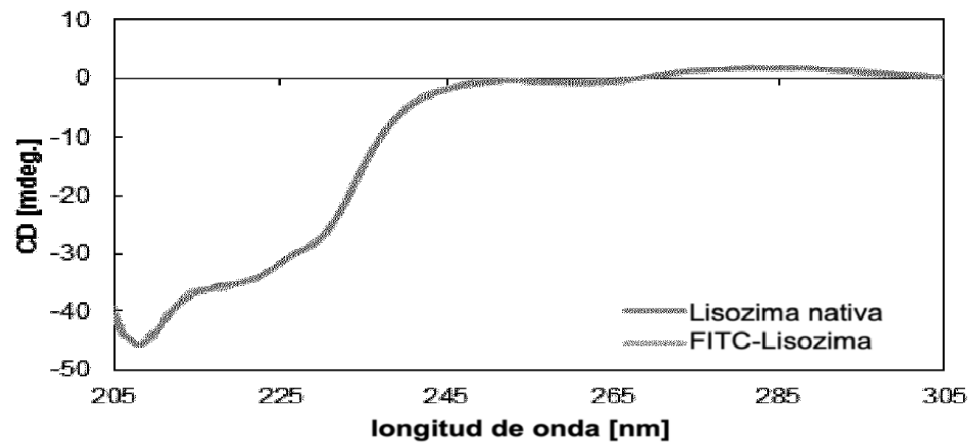
Evaluación del reconocimiento molecular a través de la modificación con RADA a la proteína (ensayo de ELISA)



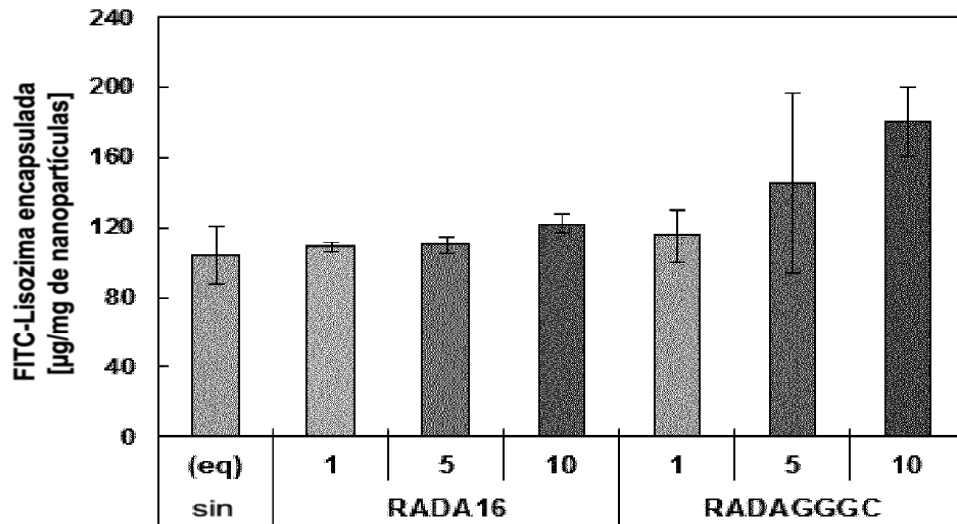
[FIG. 6]



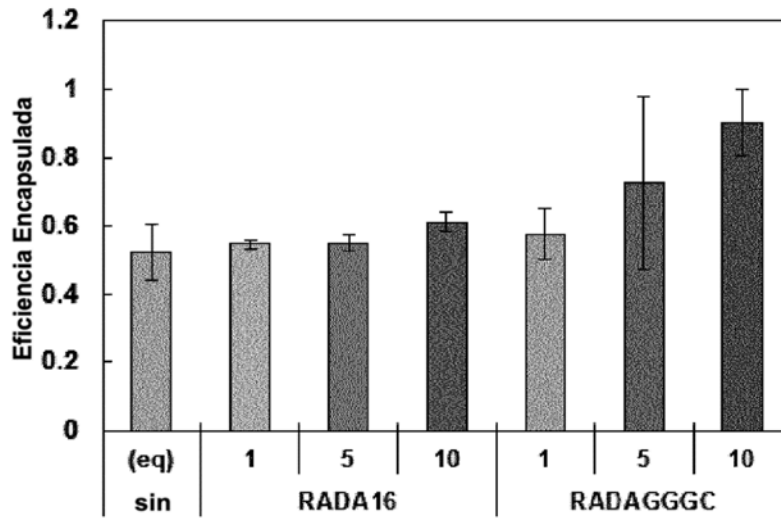
[FIG. 7]



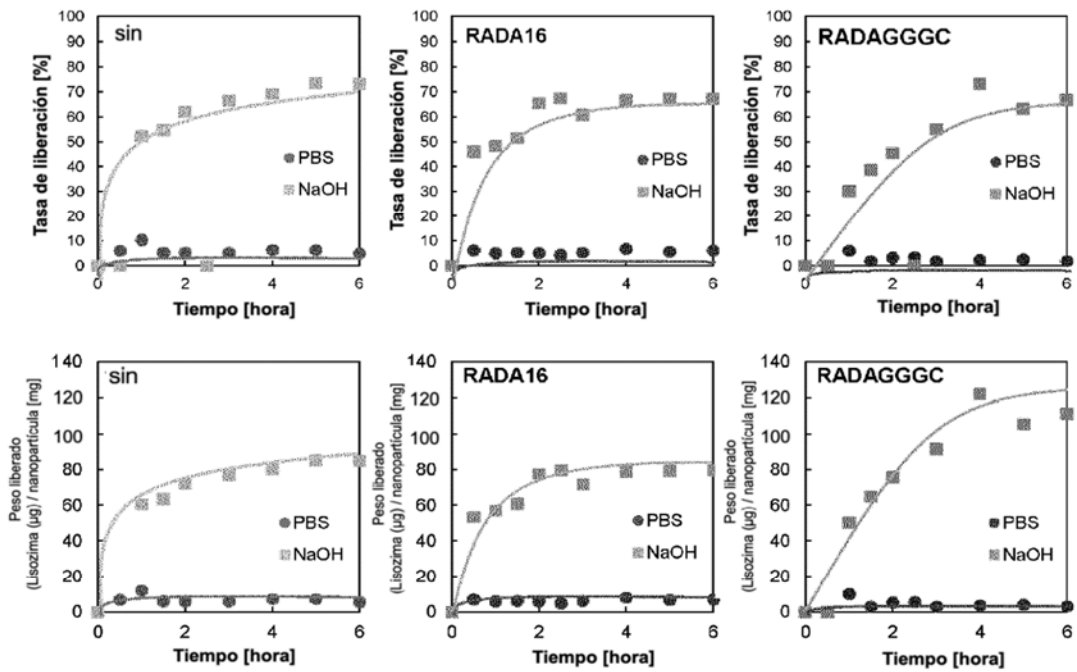
[FIG. 8]



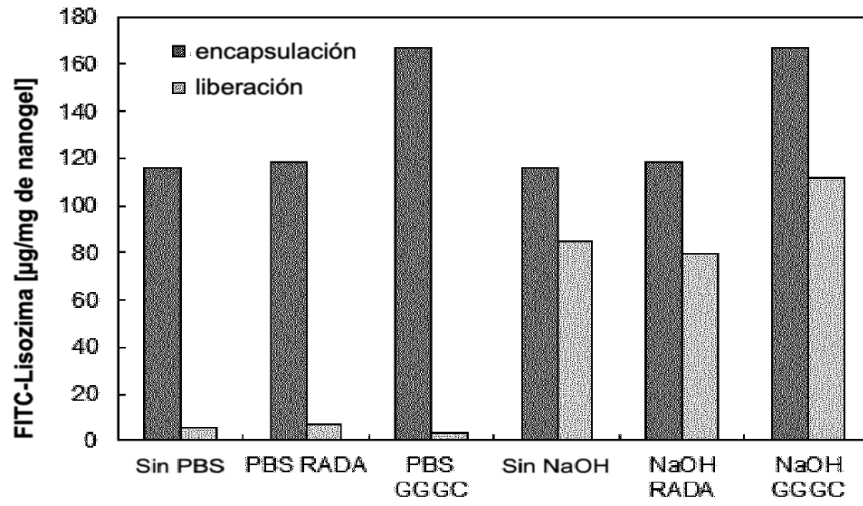
[FIG. 9]



[FIG. 10]



[FIG. 11]



[FIG. 12]

