

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 684**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2008** **E 11152915 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013** **EP 2308514**

54 Título: **Conjugados para el suministro dirigido de fármacos a través de la barrera hematoencefálica**

30 Prioridad:

23.03.2007 US 907176 P

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

24.10.2013

73 Titular/es:

**TO-BBB HOLDING B.V. (100.0%)
J.H. Oortweg 19
2333 CH Leiden, NL**

72 Inventor/es:

GAILLARD, PIETER JAAP

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 426 684 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados para el suministro dirigido de fármacos a través de la barrera hematoencefálica

Campo de la invención

5 Está invención pertenece al campo del suministro dirigido de fármacos. La invención se refiere a conjugados que se pueden obtener haciendo reaccionar diestearoilfosfatidiletanolamina–poletilenglicol–maleimida (DSPE-PEG-MAL, por sus siglas en inglés) con glutatión reducido. Estos conjugados se usan para preparar medicamentos para el suministro dirigido de fármacos en y a través de la barrera hematoencefálica.

Antecedentes de la invención

10 Un virus es una partícula microscópica que puede infectar las células de un organismo. Los virus únicamente pueden replicarse infectando una célula hospedadora y por tanto no pueden reproducirse por su cuenta. En el nivel más básico, los virus están constituidos por material genético, ADN y/o ARN, contenido en un recubrimiento proteico protector denominado cápsida. Para penetrar en una célula, el virus se adhiere a la superficie celular a través de la unión a un receptor específico. Posteriormente, la célula incorpora el virus ya sea por medio de una fusión de membrana celular directa (utilizando péptidos que penetran en la célula) o a través de una vesícula endocítica. Los virus utilizan la maquinaria y el metabolismo de la célula hospedadora para producir múltiples copias de ellos mismos a través de un ciclo lisogénico y/o lítico. Los viriones liberados pueden transmitirse entre hospedadores ya sea por contacto directo, normalmente a través de fluidos corporales, o a través de un vector. En ambientes acuosos, los virus pueden flotar libremente en el agua.

20 En la actualidad, las opciones para el tratamiento de afecciones víricas son limitadas. La terapias antivíricas pueden bien dirigirse al virus antes de que entre en la célula, como es el caso en la inmunización pasiva (es decir, terapias de anticuerpos) y en la inmunización activa o vacunaciones, o bien interferir con la incorporación intracelular y/o los ciclos de replicación del virus, por medio de los cuales los interferones de tipo I, y sus inductores, aumentan los mecanismo antivíricos naturales del cuerpo.

25 Para que los fármacos antivíricos alcancen sus dianas intracelulares, necesitan suministrarse a través de la membrana celular lipofílica, al interior del citoplasma hidrofílico. Este requerimiento del transporte de lipofílico a hidrofílico supone un desafío para el diseño y suministro de fármacos antivíricos de este tipo.

30 Los fármacos antivirales eficaces y comercializados actualmente pertenecientes a la clase de los compuestos activos intracelularmente, como los análogos de nucleósidos, inhibidores de proteasas y fármacos basados en ácidos nucleicos, son fármacos hidrofílicos y por tanto su incorporación intracelular es, normalmente, muy deficiente, pero generalmente tienen buenas propiedades de seguridad y farmacocinéticas, lo que permite una exposición sistémica muy alta al fármaco. En algunos casos, estos fármacos se acumulan selectivamente a través de portadores de incorporación endógenos, tales como p. ej., transportadores de aniones o nucleósidos, en las células y órganos con una expresión elevada de estos portadores de incorporación. Sin embargo, esto puede impedir que los fármacos antivíricos alcancen una concentración eficaz en los compartimentos intracelulares de las células diana, es decir, células infectadas con un virus, y/o presenten una toxicidad limitante de la dosis en las células y órganos con una elevada expresión de estos portadores de incorporación.

40 Un aumento de la lipofilicidad de los fármacos dará como resultado una solubilidad relativamente mayor en las membranas ricas en lípidos y también una mayor afinidad por las bombas de eflujo de múltiples fármacos inducibles por fármacos, lo que da lugar en ambos casos a concentraciones citosólicas del fármaco variables y reducidas así como una mayor probabilidad de una toxicidad limitante de la dosis sistémica para el fármaco.

45 El suministro de fármacos en forma no fosforilada puede mejorar la entrada en la célula del fármaco, ya que la membrana celular es poco permeable a los fármacos fosforilados. Posteriormente, una timidina-cinasa puede fosforilar el fármaco para dar su forma activa. Sin embargo, tendrá lugar una incorporación no específica del fármaco por parte de todos los tejidos corporales, incluido el sistema nervioso central (SNC). Otro inconveniente es que conseguir niveles plasmáticos del fármaco en equilibrio estacionario puede llevar hasta 4 semanas de administración. En la actualidad, los tratamientos requieren la administración diaria de dosis elevadas (800-1200 mg/día) durante períodos de 24-48 semanas. Esto es demasiado tarde para el tratamiento de afecciones que no son crónicas, tales como las enfermedades (sub)agudas inducidas por virus. Otro inconveniente más es que tales tratamientos normalmente están limitados por la toxicidad, donde los efectos secundarios más frecuentes son el desarrollo de anemia hemolítica o daño renal, y requieren ya sea una reducción o interrupción de la dosis en ciertos pacientes, con la consiguiente reducción en la respuesta a la terapia. De hecho, el porcentaje de pacientes que logran una respuesta vírica sostenida utilizando fármacos de este tipo es normalmente, en el mejor de los casos, de un 50-60%, aunque esos fármacos hayan sido eficaces contra el virus particular en los ensayos *in vitro*.

55 En conclusión, en la terapia y tratamiento antivíricos se necesita un modo de suministrar una cantidad de fármacos eficaz en un período de tiempo adecuado y en el sitio deseado y que a la vez minimice los efectos secundarios. Tal vez el mayor desafío resida en el suministro temporal adecuado de un fármaco antivírico a los sitios protegidos por barreras fisiológicas, tales como el sistema nervioso central (SNC), la retina y los testículos.

Hay todavía una cantidad significativa de necesidades médicas no cubiertas en lo que respecta a la población de pacientes (que están envejeciendo), que crece rápidamente y que en su mayor parte reciben un tratamiento insuficiente, los cuales sufren trastornos neurológicos potencialmente mortales o que son seriamente inhabilitantes o trastornos del sistema nervioso central (SNC), como la encefalitis vírica. Una razón concreta es que la mayoría de los fármacos encuentran dificultades para cruzar “el cortafuegos” del cerebro, la barrera hematoencefálica. El cerebro es el órgano más complejo y sensible del cuerpo humano. Requiere un balance delicado de neurotransmisores y de iones alrededor de las neuronas para funcionar correctamente, y muchos compuestos endógenos y exógenos potencialmente neurotóxicos amenazan constantemente la homeostasis del cerebro. Al igual que un cortafuegos protege un ordenador de intrusos potencialmente dañinos de internet, las barreras funcionales y físicas en los vasos sanguíneos del cerebro sirven para proteger las neuronas. Estas barreras consiguen esto al excluir, expeler y metabolizar compuestos potencialmente neurotóxicos (incluidas las proteínas plasmáticas, citocinas, anticuerpos, fármacos, bacterias y virus) de la sangre y el cerebro. Esta barrera denominada la barrera hematoencefálica, o BHE, se caracteriza por una capa celular endotelial muy tupida especializada de una manera única que cubre los vasos sanguíneos más pequeños (capilares) en el cerebro. Para la incorporación de nutrientes esenciales, sin embargo, la barrera hematoencefálica está equipada con sistemas de portadores específicos y receptores de incorporación. Al igual que el cortafuegos de un ordenador tiene puertos dedicados a la comunicación con internet. Teniendo en cuenta que prácticamente cada neurona es perfusionada por sus propios capilares, la manera más eficaz de suministrar fármacos al cerebro se lograría a través de esos capilares. De hecho, la longitud total de los capilares del cerebro humano es impresionante (-600 km) con una gran área superficial (-20 m²) para un intercambio eficaz de fármacos. Los fármacos del SNC comercializados en la actualidad son, por tanto, normalmente compuestos altamente hidrosolubles y con un peso molecular muy bajo (-300 Da) o compuestos muy liposolubles, de modo que estos compuestos pueden cruzar la barrera hematoencefálica por difusión. Sin embargo, las principales limitaciones de los fármacos altamente lipofílicos son que los compuestos de este tipo tienen propiedades farmacológicas deficientes, son normalmente sustratos con una alta afinidad por los transportadores de eflujo de fármacos y presentan toxicidades limitantes de la dosis en su rango terapéutico. De manera alternativa, los fármacos comercializados con un peso molecular bajo mimetizan a los sustratos endógenos de los portadores de incorporación (p. ej., el fármaco del Parkinson L-dopa utiliza un portador aminoacídico para cruzar la barrera hematoencefálica). Aún no hay fármacos del SNC en el mercado cuya diana específica sean los receptores de incorporación. Una gran parte de los fármacos comercializados para el tratamiento de los trastornos neurológicos (como el accidente cardiovascular, la migraña y la EM) están, de hecho, dirigidos contra dianas externas al cerebro (p. ej., la vascularización cerebral o el sistema inmunitario). Al contrario que las moléculas con un peso molecular bajo, los fármacos biofarmacéuticos son candidatos poco apropiados para modificaciones químicas que mejoren su permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica. En la actualidad, los compuestos de este tipo se basan en tecnología invasivas y perjudiciales para los pacientes, como las inyecciones esterotáxicas locales y directas, las infusiones intracatecales e incluso la rotura (farmacológica) de la barrera hematoencefálica. Debido a las graves consecuencias neurológicas de estas técnicas, únicamente están justificadas en un grupo seleccionado de trastornos potencialmente mortales. Además, las administraciones locales distan mucho de ser eficaces a la hora de suministrar fármacos a lo largo de todo el cerebro humano. Por tanto, se esperan con gran impaciencia tecnologías innovadoras para el suministro de fármacos en el SNC.

A pesar de esfuerzos considerables, hasta la fecha estas estrategias no han dado lugar a muchos fármacos del SNC nuevos y seguros. Para resumir brevemente, el primero comprende los fármacos activos del SNC “naturales” comercializados en la actualidad que son sustitutos probables para indicaciones adicionales del SNC donde, basándose en la química médica avanzada, se han obtenido (*in silico*) muchas colecciones de cribado de compuestos que penetran en el SNC que pueden proporcionar nuevos fármacos para del SNC. En segundo lugar, se están desarrollando muchos vectores que penetran en las células basados en vectores víricos y vectores peptídicos. En tercer lugar, se están explorando las tecnologías para sortear la barrera hematoencefálica, como las inyecciones esterotáxicas, las bombas de infusión intracatecal/ICV, las células productoras de fármacos encapsulados, la administración nasal e inhaladores, para suministrar (localmente) fármacos (biofarmacéuticos) en el cerebro. En cuarto lugar, las tecnologías que mejoran la absorción cerebral provocando fisuras en la barrera hematoencefálica para las moléculas con un bajo peso molecular, que incluyen el RMP-7, la rotura osmótica y los inhibidores de la bomba de eflujo de fármacos (P-glucoproteína), han sido todas ellas ampliamente estudiadas en ensayos clínicos y, aunque eficaces, las compañías las han abandonado debido a problemas acerca de su seguridad. Finalmente, las modificaciones químicas/formulaciones de potenciales fármacos del SNC (como la síntesis de profármacos que penetran la barrera hematoencefálica o la lipidificación de fármacos) son estrategias que mejoran el suministro cerebral de los fármacos del SNC con un peso molecular bajo. Las tecnologías de este tipo alteran principalmente únicamente la distribución del fármaco a lo largo de todo el cuerpo, lo que da como resultado una captación por parte del cerebro moderadamente mayor. Esto aumenta la posibilidad de efectos secundarios periféricos. Al contrario que las moléculas con un peso molecular bajo, es improbable que los fármacos biofarmacéuticos sean candidatos a modificaciones químicas para mejorar su permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica, con la excepción de la cationización. Una endocitosis mediada por adsorción, mecanismo de acción empleado por vectores peptídicos y en la cationización, puede, sin embargo, provocar efectos secundarios neurotóxicos ya que es algo que va en contra de la naturaleza neuroprotectora de la barrera hematoencefálica. Otras tecnologías son locales o perjudiciales para los pacientes y, por tanto, solamente se permite su aplicación en un grupo seleccionado de enfermedades potencialmente mortales. Aunque las indicaciones del SNC seleccionadas se beneficiarán ciertamente de estas estrategias, la mejor manera de conseguir el suministro específico y extendido

de fármacos a través de la barrera hematoencefálica sería actuando sobre los receptores (de transporte) de incorporación que internalizan de manera endógena de los capilares del cerebro, sin afectar la integridad de la barrera hematoencefálica neuroprotectora.

5 En la actualidad, aún no hay fármacos comercializados que empleen tecnologías de fármacos dirigidos en el SNC. Se están desarrollando fármacos dirigidos en el SNC que son moléculas con un peso molecular bajo basándose en los sustratos endógenos de los portadores de incorporación (como el usado por la L-dopa). Sin embargo, tales portadores de incorporación permiten muy pocas modificaciones químicas de los sustratos endógenos, lo que hace que esta estrategia sea útil únicamente para un número pequeño e impredecible de potenciales fármacos del SNC.

10 Es un objeto de la invención proporcionar un método versátil, eficaz y seguro para transportar carga, tal como liposomas y proteínas grandes que contienen fármacos y genes, a través de la membrana celular y a través de una barrera hematotislular tal como la barrera hematoencefálica para, entre otras cosas, dirigir fármacos en el SNC.

Descripción de la invención

Definiciones

15 Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido", tal como se emplean en la presente, incluyen oligo- y polímeros lineales de monómeros modificados o naturales o uniones, incluidos los desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, sus formas α -anoméricas, ácidos nucleicos de tipo poliamida y similares, capaces de unirse de manera específica al polinucleótido diana por medio de un modelo regular de interacciones monómero-monómero (p. ej., nucleósido-nucleósido), tales como un apareamiento de bases de tipo Watson-Crick, apareamiento de bases de tipo Hoogsteen o Hoogsteen inverso o similares. Normalmente, los monómeros se unen por enlaces de tipo fosfodiéster o análogos de estos para formar oligonucleótidos con un tamaño comprendido entre unas pocas unidades monoméricas, p. ej., 20 3-4, y varios cientos de unidades monoméricas. Siempre que un oligonucleótido se represente por medio de una secuencia de letras, tal como "ATGCCTG" se sobreentenderá que los nucleótidos están en orden 3' desde la izquierda a la derecha y que "A" se refiere a desoxiadenosina, "C" se refiere a desoxicitidina, "G" se refiere a desoxiguanosina y "T" se refiere a timidina, a menos que se especifique lo contrario. Los análogos de uniones de tipo fosfodiéster incluyen el fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforanilidato, fosforamidato, fosforamidato N3'→P5' y similares. Un polinucleótido puede tener sustancialmente cualquier longitud, normalmente de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 1×10^9 nucleótidos o mayores. Tal como se emplea en la presente, un "oligonucleótido" se define como un polinucleótido con una longitud de 4 a 100 nucleótidos. Por tanto un oligonucleótido es un subconjunto de polinucleótidos.

30 Tal como se emplea en la presente, la expresión "unión específica" se refiere a una unión que es cuantificablemente diferente de una interacción no específica. La unión específica se puede medir, por ejemplo, determinando la unión de una molécula (ligando) en comparación con la unión de una molécula de control (ligando), la cual generalmente es una molécula con una estructura similar que no tiene actividad de unión, por ejemplo, un péptido de tamaño similar que carece de una secuencia de unión específica. La unión específica está presente si un ligando tienen una afinidad cuantificablemente mayor por el receptor que el ligando de control. La especificidad de unión se puede determinar, por ejemplo, por competición con un ligando de control que se sabe que se une a una diana. La expresión "unión específica" como se emplea en la presente, incluye tanto la unión específica de afinidad elevada y como la de afinidad baja. La unión específica se puede poner de manifiesto, p. ej., mediante un agente de direccionamiento de baja afinidad que tiene una K_d de al menos aproximadamente 10^{-4} M. P. ej., si un receptor tiene 35 más de un sitio de unión para un ligando, un ligando de afinidad baja puede ser útil para actuar sobre el endotelio microvascular. La unión específica también se puede poner de manifiesto mediante ligandos de afinidad elevada, p. ej., un ligando que tiene una K_d de al menos aproximadamente 10^{-7} M, al menos aproximadamente 10^{-8} M, al menos aproximadamente 10^{-9} M, al menos aproximadamente 10^{-10} M, o que puede tener una K_d de al menos aproximadamente 10^{-11} o 10^{-12} M o mayor. Tanto los ligandos de direccionamiento de afinidad elevada como los de afinidad baja son útiles para ser incorporados en los conjugados de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en este mecanismo denominado endocitosis mediada por receptores, un mecanismo de transporte (atóxico) endógeno y seguro para transportar restos terapéuticos, tales como liposomas y proteínas grandes que contienen fármacos y genes a través de una membrana celular o a través de una membrana celular o a través de una barrera hematotislular tal como la barrera hematoencefálica para, p. ej., suministrarlos en el cerebro. Una gama de receptores de internalización bien conocidos y validados están presentes en las células y en la barrera hematoencefálica para uso de las realizaciones de la presente invención. Estos incluyen, pero sin carácter limitante, el transportador de tiamina, el receptor de alfa(2,3)-sialoglucoproteína, el receptor de la transferrina, los receptores scavenger, los receptores de LDL, LRP1B, LRP2, DTR, receptor de la insulina, receptor de IGF, receptor de leptina, receptor de manosa-6-fosfato. La presente invención se refiere por tanto a un modo seguro y eficaz de suministrar fármacos de manera específica a las células y a través de la barrera hematoencefálica actuando sobre los receptores (de transporte) de incorporación que internalizan de manera endógena de los capilares del cerebro, sin afectar a la integridad de la barrera hematoencefálica neuroprotectora.

En un primer aspecto la presente invención se refiere a un conjugado que se puede obtener haciendo reaccionar diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenglicol-maleimida (DSPE-PEG-MAL) con glutatión reducido.

Un "conjugado" se define en la presente como constituido por dos entidades que se acoplan. Preferentemente, las dos entidades se conjugan mediante interacción proteína-proteína específica o no específica, mediante enlace covalente, mediante enlace no covalente o por enlace químico de coordinación. En el contexto de la presente invención, la primera entidad puede ser un agente antivírico o un portador farmacéuticamente aceptable que comprenda el agente antivírico, tal como se define a continuación, mientras que la segunda entidad será normalmente un ligando para un receptor de una célula diana tal como se define posteriormente en la presente.

Agentes antivíricos

Los conjugados de la invención pueden comprender al menos un agente antivírico. Un "agente antivírico" (o un fármaco o componente antivírico) se define en la presente como un agente que aniquila virus o suprime su replicación y, por tanto, inhibe su capacidad para multiplicarse y reproducirse. En un conjugado preferido de la invención, el agente antivírico es un agente antivírico activo intracelularmente. Se pretende que en la presente un "agente antivírico activo intracelularmente" se refiera a un agente que actúa con el fin de inhibir la infección vírica y preferentemente inhibe la replicación vírica en una célula infectada por un virus, al contrario que los anticuerpos neutralizadores que son capaces de neutralizar viriones que circulan extracelularmente. Normalmente un agente antivírico activo intracelularmente interfiere con un paso esencial del metabolismo replicativo del virus.

Un agente antivírico activo intracelularmente para incorporar en los conjugados de la invención es un agente antivírico químico. Se pretende que en la presente un agente antivírico químico se defina como una molécula química, normalmente una molécula no polimérica con un peso molecular más bajo (p. ej., inferior a 2kDa), que es al menos parcialmente orgánica, que normalmente se puede obtener por síntesis química y que no comprende un oligo- o polinucleótido. Un agente antivírico químico preferido para incorporar en los conjugados de la invención es un agente constituido al menos por uno de los siguientes: un análogo de nucleósidos, un inhibidor de la transcriptasa inversa, un inhibidor de proteasas y un inhibidor de la neuraminidasa. Los ejemplos adecuados de agentes antivíricos químicos para incorporar en los conjugados de la invención incluyen, p. ej., el nucleótido inhibidor de la transcriptasa inversa (NtRTI) tenofovir disoproxil fumarato; los inhibidores de la transcriptasa inversa que no son nucleósidos (NNRTIs) nevirapina, delavirdina y efavirenz; los inhibidores de proteasas saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir, darunavir y atazanavir; los inhibidores de la neuraminidasa peramivir, zanamivir (Tamiflu) y oseltamivir (Relenza); amantadina y rimantadina; y adefovir dipivoxil, famciclovir, penciclovir, imiquimod, docosanol, foscarnet (PFA), maribavir, BAY 38-4766, GW275175X, MVE-1, MVE-2, AM-3, AM-5, mannozom, bropirimina, triclorhidrato de la 3,6-bis(2-*p*-peridinoetoxi)acridina, fenilnamina, 2-amino-5-halo-6-*aril*-4(3*H*)pirimidinonas, 2-amino-5-bromo-6-metil-4(3*H*)pirimidinona, 7,8-didehidro-7-metil-8-tioxoguanosina, 7-deazaguanosina, melatonina, 8-cloro-7-deazaguanosina, CL246,738, glicirricina, pleconaril, bananina, yodobananina, vanilbananina, ansabananina, eubananina, adeninobananina, cloroquina, valinomicina y compuestos como los detallados en los documentos WO2006119646, WO2005107742, EP1736478, EP1707571, WO2004062676, EP1674104, WO2006060774, WO2006121767.

Los análogos de nucleósidos antivíricos adecuados para incorporar en los conjugados de la invención incluyen análogos de nucleósidos que poseen una base o azúcar alterado, o ambos. Los ejemplos de análogos de nucleósidos adecuados incluyen, p. ej., idoxuridina, aciclovir (acicloguanosina), valaciclovir, ganciclovir, valganciclovir, arabinósido de adenosina (AraA, Vidarabina), monofosfato de AraA, arabinósido de citosina (AraC, citarabina), monofosfato del arabinósido de citosina (Ara-CMP), azidotimidina (AZT), 1-beta-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida (ribavirina o RBV), 5-etinil-1-beta-D-ribofuranosilimidazol-4-carboxamida (EICAR), monofosfato de EICAR, ribamidina, ribavirina 2',3',5'-triacetato, 5'-sulfamato de ribavirina, ribavirina 5'-trifosfato, ribavirina 5'-monofosfato, ZX-2401, ácido micofenólico, tiazofurina, tiazofurina 5'-monofosfato, tiazofurina 2',3',5'-acetato, 7-tia-8-oxoguanosina, selenazofurina, pirazofurina, derivados de furanonaftoquinona, merimepodib (VX497), viramidina, 6-azauridina, 9-(2-fosfonilmetoxietil)guanina (PMEG), (S)-9-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxietil)-2,6-diaminopurina (PMEDAP), didenosina (DDI), didesoxicitosina (DDC), estavudina (d4T), epivir (3TC), abacavir (ABC), yododesoxiuridina (DU) y bromovinil desoxiuridina (BVDU o brivudina), (S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil)citosina (HPMPC, cidofovir, CDV o Vistide®), HPMPC cíclico, hexadeciloxipropilcidofovir (HDP-CDV, o CMX001), 3-deazaguanina (3-DG), 3-deazauridina, 9-(S)-(2,3-dihidroxipropil)adenina ((S)-DHPA), zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina, lamivudina, abacavir y emtricitabina.

En una realización alternativa de los conjugados de la invención, el agente antivírico es un agente que comprende un oligo- o polinucleótido. Un agente antivírico que comprende un oligo- o polinucleótido puede ser cualquiera de los siguientes: una vacuna de ADN, un oligonucleótido no codificante, un ribozima, una molécula de ARN o ADN catalítico (ADNzima), un ARNip o un constructo de expresión que codifica estos. Se pretende que en la presente una vacuna de ADN se refiera a un constructo de un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un antígeno vírico, que es capaz de expresar el antígeno tras la introducción del constructo en una célula del organismo hospedador que se va a vacunar con la vacuna de ADN.

Los agentes antivíricos activos intracelularmente adecuados que comprenden oligo- o polinucleótidos incluyen, p. ej., vacunas de ADN (US20050163804), oligonucleótidos no codificantes (ISIS 13312, ISIS 2922 (fomivirsén), ISIS 3383,

ISIS 5320, GEM 132), ribozimas, moléculas de ARN o ADN catalítico (ADNzimas) (como se detalla, pero sin carácter limitante, en los documentos WO2006064519, WO2005085442), ARNip o plásmidos que codifican estos (p. ej., como se detalla, pero sin carácter limitante, en los documentos WO2006042418, WO2006041290, WO2006074346, WO2006062596, WO2006110688, WO2005056021, WO2005076999, WO2006121464, WO2005019410; 5 WO03079757, WO2006096018, WO2006129961, WO2006031901, WO02081494, WO2005028650, WO03070750), o combinaciones de estos y similares.

Los agentes antivíricos preferidos para usar de acuerdo con la invención son agentes que son específicos o tienen una especificidad suficiente respecto a las células infectadas por virus mientras que presentan una toxicidad mínima respecto a las células hospedadoras no infectadas. Esta especificidad respecto a las células infectadas por parte del agente se puede expresar como el "índice de selectividad", el cual se define en la presente como el 50% de la concentración citostática (CC50) respecto a la célula diana dividido por el 50% de la concentración eficaz (EC50) que resulta tóxica para un virus. Lo deseable es un índice de selectividad que favorezca el uso del agente antivírico. En una realización preferida, el índice de selectividad está comprendido entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 000, más preferentemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 000, incluso 15 más preferentemente entre aproximadamente 100 y aproximadamente 100 000, aún más preferentemente entre aproximadamente 1000 y aproximadamente 100 000. El índice de selectividad es, por tanto, de manera preferente al menos aproximadamente 1, 10, 100, 1000, 10 000 o 100 000.

En una realización preferida el agente antivírico que se usa de acuerdo con la invención es al menos uno de los siguientes: ribavirina, cidofovir, ganciclovir, aciclovir, zanamivir y oseltamivir.

20 Ribavirina

La ribavirina (originalmente también conocida como Virazole; Copegus®; Rebetol®; Ribasphere®; Vilona®; Virazole®, también como genéricos de Sandoz, Teva, Warrick) es un compuesto químico sintético que no se encuentra en la naturaleza. Se sintetizó por primera vez en 1970 en ICN Pharmaceuticals, Inc. (posteriormente Valeant Pharmaceuticals International). La ribavirina se descubrió en una búsqueda sistemática de nucleósidos 25 sintéticos con actividad antitumoral y antivírica por parte de ICN. Esta se inspiró en parte en el descubrimiento (en la década de 1960) de la actividad antivírica de antibióticos nucleosídicos naturales similares a la purina como la showdomicina, coformicina y pirazomicina. Estos agentes resultaron ser demasiado tóxicos para ser útiles clínicamente (y su actividad antivírica podría ser fortuita), pero sirvieron como punto de partida para los químicos farmacéuticos interesados en agentes quimioterapéuticos antimetabólicos y antivíricos. En 1972 se publicó que la ribavirina era activa contra varios virus con ADN y virus con ARN en cultivo y en animales sin ninguna toxicidad 30 indebida. La ribavirina protegió a los ratones contra la mortalidad frente a las cepas A y B de la gripe y, originalmente, ICN planeó comercializarlo como un fármaco contra la gripe. Sin embargo, los resultados en ensayos en humanos contra la infección experimental de gripe fueron variados y la FDA no aprobó en última instancia esta indicación para el uso de ribavirina en humanos. Aunque se permitió en 1980 que ICN comercializara la ribavirina, en forma inhalada, para la infección por el virus sincitial respiratorio (RSV, por sus siglas en inglés) en niños, el mercado de los EE. UU. para esta indicación era pequeño. Cuando la ribavirina oral fue finalmente aprobada por la FDA en 1998 como parte de un tratamiento combinado (con interferón) para la hepatitis C, las patentes originales de ICN sobre la propia ribavirina ya habían vencido y (a pesar de las disputas posteriores sobre la patente) la ribavirina se había convertido esencialmente en un fármaco genérico.

40 La ribavirina es un fármaco antivírico que es activo contra varios virus con ARN y virus con ADN. Es un miembro de los fármacos antimetabolitos nucleosídicos que interfieren con la duplicación del material genético vírico. Aunque no es eficaz contra todos los virus, la ribavirina es destacable como una molécula con peso molecular bajo debido a su amplio rango de actividad, que incluye una actividad importante contra gripes, flavivirus y agentes de muchas fiebres hemorrágicas víricas. La ribavirina es un profármaco, activado por las cinasas celulares que lo transforman en un nucleótido 5' trifosfato. En esta forma interfiere con aspectos del metabolismo del ARN relacionados con la 45 reproducción vírica. Sin pretender ceñirse a ninguna teoría, se han propuesto varios mecanismos para esto, pero no se ha probado ninguno de ellos. Puede que más de un mecanismo sea activo. En los EE. UU., la forma oral (cápsula o comprimido) de ribavirina se usa en el tratamiento de la hepatitis C, en combinación con fármacos de tipo interferón. La forma de aerosol se utiliza para tratar las enfermedades relacionadas con el virus sincitial respiratorio en niños. En México, la ribavirina se ha comercializado para emplearla contra la gripe.

El principal efecto adverso grave de la ribavirina es la anemia hemolítica, la cual puede empeorar una enfermedad cardiaca preexistente. Este efecto es dependiente de la dosis y, en ocasiones, puede compensarse disminuyendo la dosis, sin embargo, se desconoce cuál es el mecanismo del efecto adverso. La ribavirina no se incorpora sustancialmente en el ADN, pero posee un efecto inhibitor dependiente de la dosis sobre la síntesis del ADN, así 55 como otros efectos sobre la expresión génica. Sin querer ceñirse a ninguna teoría, estas pueden ser las razones de los significativos efectos teratogénicos que se han advertido en todas las especies animales que no son primates en las que se ha probado la ribavirina. La ribavirina no produjo defectos congénitos en babuinos, pero esto no es una indicación de que sea seguro en humanos. Por tanto, se recomiendan dos formas simultáneas de control de la natalidad durante el tratamiento de cualquiera de los componentes de la pareja y que continúe en los seis meses 60 posteriores al tratamiento. Se recomienda que las mujeres que están embarazadas o que desean estarlo no tomen ribavirina. En lo que respecta a la teratogenicidad, la prolongada vida media de la ribavirina en el cuerpo es una

cuestión especialmente preocupante. Los glóbulos rojos (eritrocitos) concentran el fármaco y son incapaces de excretarlo, de modo que esta fracción no se elimina por completo hasta que tiene lugar el recambio de todos los glóbulos rojos, un proceso que se estima que puede durar hasta 6 meses. Por tanto, en teoría, la ribavirina puede seguir siendo un peligro para la reproducción hasta 6 meses después de la finalización de la administración del fármaco. En la actualidad, los materiales de información del envasado del fármaco en los EE. UU. incluyen esta advertencia.

Los datos experimentales indican que la ribavirina puede poseer una actividad útil contra muchos virus de interés, incluidos el de la gripe (aviar), hepatitis B, polio, sarampión y viruela. La ribavirina es el único tratamiento conocido para una serie de fiebres hemorrágicas víricas, incluidos el virus Ébola, virus Marburgo, la fiebre de Lassa, la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo y la infección por Hantavirus. La ribavirina es activa en un modelo de hámster de fiebre amarilla, un hallazgo que no es sorprendente, dada la relación entre los virus de la hepatitis C y de la fiebre amarilla, ambos pertenecientes a la familia *Flaviviridae*. La ribavirina es activa contra otros *flaviviridae* importantes tales como el virus del Nilo Occidental y el dengue.

El grupo carboxamida de la ribavirina se puede asemejar a la adenina o guanósina, dependiendo de su rotación, y por esta razón cuando se incorpora la ribavirina en el ARN, se empareja igualmente bien con la citosina como con la uridina, e induce mutaciones en la replicación dependiente del ARN en los virus con ARN. Tal hipermutación puede ser letal para los virus con ARN. Además, la ribavirina 5' mono-, di- y trifosfato son todos ellos inhibidores de ciertas ARN polimerasas víricas dependientes del ARN que son una característica de los virus con ARN (excepto de los retrovirus). Ninguno de estos mecanismos explica el efecto de la ribavirina sobre muchos virus con ADN, que sigue siendo un misterio. La ribavirina 5'-monofosfato inhibe la inosina monofosfato-deshidrogenasa celular, y de este modo merma las reservas intracelulares de GTP. Sin querer ceñirse a ninguna teoría, este mecanismo puede ser útil a la hora de explicar el efecto antirreplicativo del ADN y citotóxico general del fármaco (es decir, su toxicidad) así como algunos efectos sobre la replicación del ADN vírico. La ribavirina es un inhibidor de algunas enzimas como la ARN-guanilil-transferasa vírica y (guanina-7*N*)-metil-transferasa, y esto puede contribuir a una estructura del casquete 5' de los transcritos de ARNm vírico defectuosa y, por tanto, una traducción vírica ineficaz para ciertos virus con ADN, tales como el virus vaccinia (un virus con ADN complejo). Se ha sugerido que la incorporación de ribavirina en el extremo 5' de los transcritos de ARNm mimetizaría el casquete 7-metilguanósina del extremo de los ARNm celulares, lo que daría lugar a una traducción celular deficiente de estos. Este sería un efecto tóxico para las células, pero no parece ser importante en las concentraciones terapéuticas de la ribavirina. Cualquier diferencia entre el procesamiento por parte de las enzimas víricas y por parte de las enzimas celulares de los transcritos de ARNm que contengan ribavirina es un mecanismo potencial de inhibición diferencial de la ribavirina respecto a la traducción de los ARNm de los virus (incluidos los virus con ADN). Finalmente, se sabe que la ribavirina potencia la inmunidad mediada por linfocitos T del hospedador contra la infección vírica ya que ayuda a cambiar el fenotipo de los linfocitos T del hospedador del tipo 2 al tipo 1. Esto puede explicar la actividad antivírica de la ribavirina contra algunos virus tales como el virus de la hepatitis C, en dosis que no interfieren claramente con la replicación del virus cuando se emplean sin interferón.

La ribavirina se absorbe a partir del tracto GI probablemente por medio de transportadores de nucleósidos. La absorción es de aproximadamente un 45% y se incrementa moderadamente (hasta aproximadamente un 75%) con una comida grasa. Una vez en el plasma, la ribavirina es transportada a través de la membrana celular también por transportadores de nucleósidos. Tras varias semanas de administración diaria, la ribavirina está ampliamente distribuida por todos los tejidos, incluido el LCR y el cerebro. Las propiedades farmacocinéticas de la ribavirina están dominadas por la retención de la forma fosfatada dentro de las células, especialmente de los glóbulos rojos (GR) que carecen de la enzima para eliminar el fosfato una vez ha sido añadido por parte de las cinasas y, por tanto, alcanzan concentraciones altas del fármaco. La mayor parte de la actividad cinasa que transforma al fármaco en su forma nucleotídica activa la proporciona la adenina-cinasa. Esta enzima es más activa en las células infectadas por virus. El volumen de distribución de la ribavirina es grande (2000 L/kg) y el período de tiempo que el fármaco está retenido varía enormemente de un tejido a otro. El valor medio de la vida media para múltiples dosis en el cuerpo es de aproximadamente 12 días (30 minutos tras una dosis única), pero las cinéticas a plazos muy largos están dominadas por las cinéticas de los GR (vida media de 40 días). Los GR almacenan la ribavirina durante toda la vida de las células, liberándola en los sistemas corporales cuando las células viejas son degradadas en el bazo. Aproximadamente un tercio de la ribavirina absorbida se excreta inalterada en la orina y el resto se excreta en la orina como la base desribosilada 1,2,4-triazol-3-carboxamida y el producto de la oxidación de esta, el ácido 1,2,4-triazol-3-carboxílico.

Cidofovir

El cidofovir (HPMPC o vistide) es un fosfonato nucleosídico acíclico con un amplio espectro de actividad contra una variedad amplia de virus con ADN, incluidos los herpesvirus (virus del herpes simple de tipo 1 (VHS-1) y de tipo 2 (VHS-2), el virus de la varicela-zóster (VVZ), citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (VEB), herpesvirus humano tipo 6 (HHV-6) y los herpesvirus bovino y equino), papovavirus (virus del poliovirus humano y virus del papiloma humano (HPV)), adeno-, irido-, hepadna- y poxvirus. El cidofovir ha demostrado ser eficaz contra estos virus en diferentes sistemas de cultivo celular y/o en modelos en animales. El mecanismo de acción del cidofovir se basa en la interacción de su metabolito intracelular activo, el derivado del HPMPC difosforilado HPMPCpp, con la ADN polimerasa vírica. Se ha demostrado que el HPMPCpp bloquea la síntesis de ADN del CMV mediante la

terminación de la cadena de ADN que sigue a la incorporación de dos moléculas de HPMPc consecutivas en el extremo 3' de la cadena de ADN.

El cidofovir confiere una acción antivírica prolongada, la cual dura durante varios días o semanas, y por tanto permite una dosificación poco frecuente (es decir, semanal o cada dos semanas). Esta acción antivírica prolongada probablemente se debe a la vida media intracelular extremadamente larga de los metabolitos de HPMPc, en particular del aducto HPMPcP-colina. En estudios clínicos, el cidofovir ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de la retinitis por CMV, tanto tras la inyección intravenosa (3 o 5 mg/kg, cada dos semanas) como tras la inyección intravítrea (dosis única de 20 microgramos por ojo). Los ensayos clínicos iniciales también apuntan a la eficacia tanto del cidofovir tópico (pomada al 1%) como sistémico (intravenoso) en el tratamiento de las infecciones de VHS resistentes a aciclovir, y de cidofovir tópico (pomada o inyección) en el tratamiento de la infección de HPV anogenital, laríngea y faríngea. En la actualidad, se está tratando de emplear cidofovir en el tratamiento (intravenosos) sistémico y/o tópico de diferentes infecciones debidas a CMV, VHS, VVZ, VEB, HPV, polioma-, adeno- y poxvirus.

De manera interesante, el cidofovir es el único fármaco antivírico comercializado en la actualidad que ha demostrado ser activo contra el virus JC, el virus que causa la LMP en pacientes inmunocomprometidos, incluidos los pacientes reseñados recientemente tratados con fármacos inmunosupresores como tysabri y rituxan. El efecto secundario más importante del cidofovir es que puede ser nefrotóxico. El cidofovir también ha demostrado ser eficaz en el tratamiento del herpes resistente al aciclovir. El cidofovir puede ser eficaz contra la viruela y se puede emplear de manera limitada en caso de un ataque bioterrorista que implique casos de viruela.

Ganciclovir

El ganciclovir (GCV) fue el primer agente antivírico que se aprobó para el tratamiento de la enfermedad por CMV y sigue siendo el tratamiento de primera línea para la infección por CMV y la enfermedad por CMV en receptores de trasplantes. El GCV es un análogo de nucleósido acíclico de la 2'-desoxiguanosina. En un proceso de varios pasos dependiente tanto de las enzimas celulares como de las víricas, el ganciclovir se convierte en ganciclovir trifosfato, la forma química que es activa contra CMV. La fosforilación inicial está catalizada por un homólogo de una proteína-quinasa inusual codificado por el marco abierto de lectura de CMV UL97. Las enzimas celulares generan la forma trifosfato. El trifosfato del ganciclovir inhibe de manera competitiva la síntesis de ADN catalizada por la ADN polimerasa vírica (codificada por el gen UL54), con una elongación de la cadena más lenta que resulta de la incorporación del trifosfato del ganciclovir en lugar de dGTP en la cadena de ADN vírico que se está formando.

La absorción de la forma oral es muy limitada, aproximadamente un 5% en ayuno y aproximadamente un 8% con alimentos. Alcanza una concentración en el sistema nervioso central de aproximadamente un 50% del nivel plasmático. Aproximadamente un 90% del ganciclovir plasmático se elimina inalterado en la orina, con una vida media de 2-6 horas, dependiendo de la función renal (la eliminación tarda más de 24 horas en la enfermedad renal en fase terminal). En 1989 se aprobó una formulación intravenosa (IV) del GCV (Cytovene-IV®, Roche) para el tratamiento de la retinitis por CMV en pacientes con SIDA. La formulación IV se aprobó más tarde para la prevención de la enfermedad por CMV en receptores de trasplantes de órganos sólidos (TOS) y en individuos con infección avanzada por VIH con riesgo de contraer la enfermedad por CMV.

Los efectos secundarios del GCV incluyen efectos adversos hematológicos graves (las reacciones adversas comunes a los fármacos ($\geq 1\%$ de los pacientes) incluyen: granulocitopenia, neutropenia, anemia, trombocitopenia, fiebre, náusea, vómitos, dispepsia, diarrea, dolor abdominal, flatulencia, anorexia, enzimas hepáticas elevadas, cefalea, confusión, alucinaciones, convulsiones, dolor y flebitis en el sitio de la inyección (debido a un pH elevado), sudoración, sarpullido, comezón, creatinina sérica elevada y concentraciones de urea en la sangre) y, basándose en estudios toxicológicos preclínicos, una probable toxicidad reproductiva a largo plazo. En estudios en animales, el GCV resultó ser tanto carcinogénico como teratogénico y provocó aspermatogénesis.

Para sortear los riesgos e inconvenientes asociados a la necesidad de introducir un catéter para la administración intravenosa, se desarrolló una formulación oral. En 1994 se aprobó el GCV oral (cápsulas de GCV de 250 y 500 mg; Cytovene®, Roche) para el tratamiento de la retinitis por CMV, pero únicamente como terapia de mantenimiento, ya que la baja biodisponibilidad (aproximadamente un 5%) de la formulación oral se consideró insuficiente para la terapia de inducción. El GCV oral representó un gran avance en las opciones de tratamiento para la terapia de mantenimiento y la profilaxis. Sin embargo, la baja biodisponibilidad y el elevado consumo de pastillas de un régimen con tres tomas al día son sus limitaciones. Además, se temía que una supresión vírica inadecuada, resultado de una exposición sistémica más baja del GCV oral pudiera dar lugar a la aparición de la resistencia al fármaco. El desarrollo de los profármacos ha sido una estrategia valiosa para sortear los problemas de una solubilidad deficiente y una biodisponibilidad baja.

Hasta la fecha (2007), no se ha aprobado ningún agente contra CMV para el tratamiento de la encefalitis inducida por CMV. Sin embargo, aunque la formulación oral del GCV evitaría los considerables riesgos y desventajas asociados con la administración IV, permanecen las toxicidades hematológicas y reproductivas, lo que limita la utilidad de la terapia para todos los casos excepto para los afectados de manera más grave.

Aciclovir

El aciclovir es un fármaco antivírico análogo de guanina empleado principalmente para el tratamiento de la infección por el virus del herpes simple. Es uno de los fármacos antivíricos de uso más común y se comercializa con nombres comerciales tales como Zovirax y Zovir (GSK). El aciclovir se consideró como el inicio de una nueva era en la terapia antivírica, ya que es extremadamente selectivo y presenta una citotoxicidad baja. El aciclovir es un análogo de la 2'-desoxiguanosina. Al igual que el GCV, el aciclovir debe ser fosforilado en un proceso de varios pasos en la célula hospedadora para dar la forma activa trifosfato. El aciclovir difiere de análogos de nucleósidos previos en que contiene únicamente una estructura de tipo nucleósido parcial, el anillo del azúcar se reemplaza por una estructura de cadena abierta. La timidina-cinasa vírica, que es mucho más eficaz (3000 veces) en la fosforilación que la timidina-cinasa celular, lo transforma de manera selectiva en la forma monofosfato. Posteriormente, la forma monofosfato es fosforilada adicionalmente por cinasas celulares para dar la forma activa trifosfato, aciclo-GTP. El aciclo-GTP es un inhibidor muy potente de la ADN polimerasa vírica; tiene una afinidad aproximadamente 100 veces mayor por la polimerasa vírica que por la celular. Su forma monofosfato también se incorpora al ADN vírico, lo que da como resultado la terminación de la cadena. También se ha demostrado que las enzimas víricas no pueden eliminar el aciclo-GMP de la cadena, lo que da como resultado la inhibición de la actividad posterior de la ADN polimerasa. El aciclo-GTP se metaboliza con bastante rapidez en la célula, posiblemente por parte de las fosfatasa celulares. Por tanto, el aciclovir se puede considerar un profármaco, se administra como una forma inactiva (o menos activa) y tras la administración se metaboliza para proporcionar una especie más activa.

El aciclovir es activo contra la mayoría de las especies de la familia de los herpesvirus. En orden de actividad descendiente: virus del herpes simple de tipo I (VHS-1), virus del herpes simple de tipo II (VHS-2), virus de la varicela-zóster (VVZ), virus de Epstein-Barr (VEB) y citomegalovirus (CMV). La actividad es predominantemente activa contra el VHS y en menor grado contra el VVZ. Solo tiene una eficacia limitada contra el VEB y el CMV. Es inactivo contra virus latentes en los ganglios nerviosos. La proteína-cinasa pUL97 codificada por CMV cataliza el paso de fosforilación inicial de este análogo de purina, el cual, como el monofosfato del GCV, es di- y trifosforilado posteriormente por parte de las cinasas del hospedador. El ACV es un sustrato menos eficaz que el GCV, lo que explica en parte la potencia más baja *in vitro* del ACV en comparación con la del GCV en las células infectadas por CMV. Otro factor que diferencia claramente el ACV y el GCV es la vida media del ACV-TP, de cuatro a cinco veces menor que la del GCV-TP en las células infectadas, lo que da como resultado niveles intracelulares más bajos de la forma activa ACV-TP. Como en el caso del GCV, la resistencia al fármaco ACV es el resultado de mutaciones en la ADN polimerasa vírica o en los genes UL97.

El aciclovir es poco soluble en agua y tiene una biodisponibilidad oral baja (10-20%), por tanto, si se requieren concentraciones elevadas es necesaria la administración intravenosa. Cuando se administra por vía oral, tiene lugar un pico en la concentración plasmática al cabo de 1-2 horas. El aciclovir tiene una tasa de distribución elevada, solo un 30% está ligado a proteínas en el plasma. La vida media de eliminación del aciclovir es aproximadamente 3 horas. Se excreta por vía renal, en parte por filtración glomerular y en parte por secreción tubular.

Las reacciones adversas comunes al fármaco ($\geq 1\%$ de los pacientes) asociadas con la terapia sistémica de aciclovir (oral o IV) incluyen: náuseas, vómitos, diarrea y/o cefaleas. Se ha informado de alucinaciones con dosis elevadas. Los efectos adversos infrecuentes (0,1-1% de los pacientes) incluyen: agitación, vértigo, confusión, mareos, edema, artralgia, dolor de garganta, estreñimiento, dolor abdominal, sarpullido y/o debilidad. Los efectos adversos raros ($< 0,1\%$ de los pacientes) incluyen: coma, convulsiones, neutropenia, leucopenia, cristaluria, anorexia, fatiga, hepatitis, síndrome de Stevens-Johnson, necrólisis epidérmica tóxica y/o anafilaxia. Los efectos adversos comunes adicionales, cuando se administra el aciclovir por vía IV, incluyen encefalopatía (1% de los pacientes) y reacciones en el sitio de la inyección. La formulación para inyección es alcalina (pH 11) y la extravasación puede causar dolor tisular local e irritación. Se ha informado de deficiencia renal cuando se administra el aciclovir por vía intravenosa en dosis altas y de acción rápida, debido a la cristalización del aciclovir en los riñones. Debido a que el aciclovir se puede incorporar también en el ADN celular, es un mutágeno cromosómico, por tanto, debe evitarse su uso durante el embarazo. Sin embargo, no se ha demostrado que tenga efectos carcinogénicos ni teratogénicos. La toxicidad aguda (LD50) del aciclovir cuando se administra por vía oral es superior a 1 mg/kg, debido a la baja biodisponibilidad oral. Se ha informado de casos individuales, donde se han administrado dosis extremadamente altas (hasta 80 mg/kg) por vía intravenosa de manera accidental sin provocar ningún efecto adverso importante.

Zanamivir (Relenza)

El zanamivir (ácido 5-acetamido-4-guanidino-6-(1,2,3-trihidroxipropil)-5,6-dihidro-4H-pirano-2-carboxílico) es un inhibidor de la neuraminidasa empleado en el tratamiento y la profilaxis del virus de la gripe A y del virus de la gripe B. El zanamivir fue el primer inhibidor de la neuraminidasa desarrollado para ser comercializado.

La biodisponibilidad es de un 2% (oral) y la unión a proteínas $< 10\%$. La excreción es renal con un metabolismo insignificante y una vida media de 2,5-5,1 horas. Aunque el zanamivir ha demostrado ser un inhibidor potente y eficaz de la neuraminidasa del virus de la gripe y un inhibidor de la replicación *in vitro* e *in vivo* del virus de la gripe, esto no se traduce necesariamente en un tratamiento clínico exitoso de la gripe. En los ensayos clínicos se descubrió que el zanamivir era capaz de reducir el tiempo de resolución de los síntomas en 1,5 días siempre que se comenzara la terapia en las 48 horas posteriores al comienzo de los síntomas. Una limitación adicional se refiere a

la deficiente biodisponibilidad oral del zanamivir. Esto significa que la dosificación oral es imposible y limita la dosificación a la vía parenteral. Por eso, el zanamivir se administra por inhalación, una vía elegida para el cumplimiento de la terapia por parte del paciente. Pero incluso esta vía de administración no es aceptable para muchos en la comunidad.

5 El zanamivir fue el primero de los inhibidores de la neuraminidasa. A pesar del éxito comercial limitado de este fármaco, el trabajo y las estrategias empleadas en el desarrollo del zanamivir fueron unos primeros pasos importantes en el desarrollo de componentes adicionales de esta clase que incluye el oseltamivir y el candidato farmacológico RWJ-270201 (ensayos de fase I). Como resultado, en el futuro, se podrán desarrollar tratamientos contra la gripe más potentes y eficaces.

10 Oseltamivir (Tamiflu)

El oseltamivir (éster étilico del ácido (3*R*,4*R*,5*S*)-4-acetilamino-5-amino-3-(1-etilpropoxi)-1-ciclohexen-1-carboxílico) es un fármaco antivírico que se emplea en el tratamiento y profilaxis tanto del virus de la gripe A como del virus de la gripe B. Al igual que el zanamivir, el oseltamivir es un inhibidor de la neuraminidasa. Actúa como un inhibidor análogo del estado de transición de la neuraminidasa del virus de la gripe, impidiendo que las células infectadas liberen nuevos virus. El oseltamivir también parece ser activo contra el parvovirus canino, la panleucopenia felina, el complejo respiratorio canino conocido como la "tos de la perrera" y la enfermedad emergente denominada "gripe canina", un virus equino que comenzó a afectar a los perros en 2005. La investigación veterinaria para su uso contra la gripe canina y el parvovirus canino continúa, pero muchos albergues y grupos de rescate han informado de un gran éxito al emplear el oseltamivir en las primeras etapas de estas enfermedades.

20 El oseltamivir fue el primer inhibidor de la neuraminidasa activo por vía oral que se desarrolló para ser comercializado. Es un profármaco, el cual se hidroliza en el hígado para dar el metabolito activo, el oseltamivir con el carboxilato libre (GS4071). La biodisponibilidad es de un 75% (oral) y la excreción de GS4071 es renal con un metabolismo hepático para dar GS4071 y una vida media de 6-10 horas. El oseltamivir está indicado en el tratamiento de infecciones debidas al virus de la gripe A y B en personas de al menos un año de edad y en la prevención de la gripe en personas de al menos 1 año de edad o mayores. La dosificación normal en adultos para el tratamiento de la gripe es de 75 mg dos veces al día durante 5 días, empezando en los 2 días posteriores a la aparición de los síntomas y con dosis menores para niños y pacientes con deficiencia renal. Se puede administrar el oseltamivir como una medida preventiva ya sea durante un brote comunitario o tras un contacto estrecho con un individuo infectado. La dosificación profiláctica estándar es de 75 mg una vez al día para pacientes de 13 años de edad o mayores, la cual ha demostrado ser segura y eficaz durante un período de hasta seis semanas. También se ha descubierto que la dosis estándar recomendada suprime de manera incompleta la replicación viral en, al menos, algunos pacientes con la gripe aviar H5N1, lo que la convierte en una terapia ineficaz e incrementa el riesgo de resistencia vírica. En consecuencia, se ha sugerido que las dosis más elevadas y la duración de terapia más prolongada deberían emplearse para el tratamiento de pacientes con el virus H5N1. Se ha sugerido que la coadministración del oseltamivir con probenecid podría extender el suministro limitado del oseltamivir. El probenecid reduce la excreción renal del metabolito activo del oseltamivir. Un estudio ha mostrado que 500 mg de probenecid administrados cada seis horas duplican tanto la concentración plasmática máxima (C_{max}) como la vida media del oseltamivir, lo que incrementa la exposición sistémica global (AUC, por sus siglas en inglés) 2,5 veces.

Las reacciones adversas comunes al fármaco (ADR, por sus siglas en inglés) asociadas con la terapia con oseltamivir incluyen: náusea, vómitos, diarrea, dolor abdominal y cefalea. Las ADR raras incluyen: hepatitis y enzimas hepáticas elevadas, sarpullido, reacciones alérgicas incluida la anafilaxia y el síndrome de Stevens-Johnson. Se ha informado de otras ADR en el control posterior a la comercialización que incluyen: necrólisis epidérmica tóxica, arritmia cardíaca, convulsiones, confusión, agravamiento de la diabetes y colitis hemorrágica. En mayo de 2004, la división de seguridad del ministerio de salud de Japón ordenó cambios en la documentación que acompañaba al oseltamivir para que incorporara añadir trastornos psicológicos y neurológicos como posibles efectos adversos, incluidos los siguientes: conciencia alterada, comportamiento anormal y alucinaciones. Entre 2000 y 2004 se alegó que varios casos de trastornos psicológicos, incluidas varias muertes, estaban asociadas con la terapia con oseltamivir. El 18 de noviembre de 2005, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) publicó un informe acerca de la seguridad pediátrica del oseltamivir, el cual afirmaba que no había evidencias suficientes para establecer una relación causal entre el uso del oseltamivir y las muertes de 12 niños japoneses (solamente 2 por problemas neurológicos). Sin embargo, se recomendó la inclusión de un aviso en la información del producto acerca de sarpullidos asociados con la terapia con oseltamivir. En noviembre de 2006, los informes del comportamiento extraño de niños japoneses, incluidas tres muertes a consecuencia de caídas, hicieron que la FDA modificara la etiqueta de advertencia para incluir posibles efectos secundarios de delirio, alucinaciones u otro comportamiento relacionado.

Ligandos

La segunda entidad en los conjugados es un ligando para un receptor de una célula diana, donde el receptor es un receptor que media al menos uno de los siguientes procesos: endocitosis y transcitosis (del ligando). El suministro mediado por un receptor es una técnica de suministro dirigido de fármacos posible que se ha desarrollado en los últimos años. Tiene la ventaja potencial de un suministro sumamente específico en las células que expresan un

receptor para el ligando que está conjugado con un fármaco o un portador de un fármaco. El direccionamiento específico de agentes antiviricos terapéuticos basados en ácidos nucleicos y polipéptidos, así como de peso molecular bajo hacia las células y los tejidos se puede mejorar en gran medida a través del uso del suministro mediado por el receptor. Además, los receptores de incorporación que también se expresan en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica y las células parenquimales del cerebro (neuronas y neuroglia), permitirán un suministro específico de tales agentes antiviricos dirigidos en el sistema nervioso central (SNC) para el tratamiento, p. ej., de la encefalitis vírica. El direccionamiento mediado por un receptor puede además combinarse con sistemas de suministro de fármacos no específicos (como conjugados proteicos, PEGilación, nanopartículas, liposomas y similares) para mejorar en gran medida las propiedades de biodistribución y farmacocinéticas de los fármacos, lo que redireccionará significativamente los fármacos de manera específica hacia los órganos, tejidos y células que expresan el receptor, incluidos los protegidos por barreras hematotísulares específicas como, p. ej., el SNC, la barrera hematoencefálica (BHE), la retina y los testículos.

Por tanto, en una realización preferida, el ligando que se va a incorporar a los conjugados de la invención es un ligando para un receptor endógeno de una célula diana. Preferentemente, el ligando es un ligando para un receptor de una célula diana de vertebrados, más preferentemente un receptor de una célula diana de mamíferos y aún más preferentemente un receptor de una célula diana humana. Preferentemente, el ligando es un ligando que se une de manera específica al receptor. Preferentemente, la unión específica de un ligando a un receptor es tal como se ha definido anteriormente en la presente.

En la técnica se conocen un conjunto amplio de portadores y receptores de incorporación y un número aún mayor de ligandos específicos para un receptor. Los ligandos preferidos para los receptores que median la endocitosis y/o la transcitosis para uso de acuerdo con la presente invención incluyen, p. ej., ligandos para, o que se unen específicamente, al transportador de tiamina, receptor de folato, receptores de la vitamina B12, receptores de asialoglucoproteína, receptores de alfa(2,3)-sialoglucoproteína (con, p. ej., los nanocuerpos FC44 and FC5 constituidos por anticuerpos de dominio sencillo de llama (sdAbs) como ligandos específicos de un receptor), receptores 1 y 2 de la transferrina, receptores scavenger (de clase A o B, tipos I, II o III, o CD36 o CD163), receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés), el receptor de la proteína 1 relacionada con LDL (LRP1, por sus siglas en inglés, tipo B), el receptor LRP2 (también conocido como megalina o glucoproteína 330), el receptor de la toxina diftérica (DTR, por sus siglas en inglés, el cual es el precursor ligado a la membrana del factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina (HB-EGF, por sus siglas en inglés)), el receptor de la insulina, los receptores de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF, por sus siglas en inglés), receptores de leptina, receptor de la sustancia P, receptor de glutatión, receptores de glutamato y receptor de la manosa-6-fosfato.

Los ligandos preferidos que se unen a estos receptores incluyen, p. ej., ligandos seleccionados del grupo constituido por: lipoproteína-lipasa (LPL), α 2-macroglobulina (α 2M), proteína asociada a un receptor (RAP, por sus siglas en inglés), lactoferrina, desmoteplasa, activador del plasminógeno de tipo urocinasa y tisular (tPA/uPA, por sus siglas en inglés), inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1, por sus siglas en inglés), complejos tPA/uPA:PAI-1, melanotransferrina (o P97), trombospondina 1 y 2, lipasa hepática, inhibidor de la ruta del factor tisular/factor VIIa (TFPI, por sus siglas en inglés), factor VIIIa, factor IXa, A β 1-40, proteína precursora del β -amiloide (APP, por sus siglas en inglés), inhibidor de C1, C3 del complemento, apolipoproteína E (apoE), exotoxina A de *pseudomonas*, CRM66, proteína Tat del HIV-1, rinovirus, metaloproteínasa 9 de la matriz (MMP-9, por sus siglas en inglés), MMP-13 (colagenasa 3), proteína activadora de esfingolípidos (SAP, por sus siglas en inglés), proteína de zona del embarazo, antitrombina III, cofactor II de la heparina, α 1-antitripsina, proteína 96 del choque térmico (HSP-96), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés), apolipoproteína J (apoJ o clusterina), A β ligado a la apoJ y apoE, aprotinina, angiopep 1, lipoproteína de densidad muy baja (VLDL, por sus siglas en inglés), transferrina, insulina, leptina, un factor de crecimiento similar a la insulina, factores de crecimiento epidérmicos, lectinas, péptidos o anticuerpos monoclonales humanizados y/o peptidomiméticos específicos para dichos receptores (p. ej., las secuencias HAIYPRH y THRPPMWSPVWP que se unen al receptor de la transferrina humano o anticuerpo monoclonal A24 anti-receptor de la transferrina (TfR) humano), hemoglobina, porción atóxica de una cadena polipeptídica de la toxina diftérica, la cadena, o una parte de ella, de la toxina B diftérica (incluida DTB-His (tal como lo describen Spilberg *et al.*, 2005, *Toxicon.*, 46(8):900-6)), el mutante atóxico, o una parte del mutante, de la toxina diftérica CRM 197, la apolipoproteína B, la apolipoproteína E (p. ej., tras unirse al recubrimiento polisorb-80 de las nanopartículas), proteína de unión a la vitamina D, proteína de unión al retinol/vitamina A, proteína portadora plasmática de la cobalamina/vitamina B12, glutatión y transcobalamina-B12.

En una realización preferida, el ligando es uno de un gran número de ligandos compartidos por los receptores LRP1 y LRP2, incluida, p. ej., la lipoproteína lipasa, (LPL), la α 2-macroglobulina (α 2M), la proteína asociada a un receptor (RAP), lactoferrina, desmoteplasa, activador del plasminógeno de tipo urocinasa y tisular (tPA/uPA), inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) y complejos tPA/uPA:PAI-1.

En otra realización preferida, el ligando es más específico del receptor LRP1, incluidos, sin carácter limitante, la melanotransferrina (o P97), trombospondina 1 y 2, lipasa hepática, inhibidor de la ruta del factor tisular/factor VIIa (TFPI), factor VIIIa, factor IXa, A β 1-40, proteína precursora del β -amiloide (APP), inhibidor C1, C3 del complemento, apolipoproteína E (apoE), exotoxina A de *pseudomonas*, CRM66, proteína Tat del HIV-1, rinovirus, metaloproteínasa 9 de la matriz (MMP-9), MMP-13 (colagenasa 3), proteína activadora de esfingolípidos (SAP), proteína de zona del

embarazo, antitrombina III, cofactor II de la heparina, α 1-antitripsina, proteína 96 del choque térmico (HSP-96), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, principalmente implicado en la señalización) (154-156), en cambio la apolipoproteína J (apoJ o clusterina), A β ligado a apoJ y apoE, aprotinina, angio-pep1 y la lipoproteína de densidad muy baja (VLDL) son más específicos del receptor LRP2.

- 5 Otros ligandos preferidos son la transferrina, insulina, leptina, un factor de crecimiento similar a la insulina, factores de crecimiento epidérmicos, lectinas, péptidos o anticuerpos monoclonales humanizados y/o peptidomiméticos específicos para dichos receptores (p. ej., las secuencias HAIYPRH y THRPPMWSPVWP que se unen al receptor de la transferrina humano o anticuerpo monoclonal A24 anti-receptor de la transferrina (TfR) humano), hemoglobina, porción atóxica de una cadena polipeptídica de la toxina diftérica, la cadena, o una parte de ella, de la toxina B diftérica (incluida DTB-His), el mutante atóxico, o una parte del mutante, de la toxina diftérica CRM 197, la apolipoproteína B, la apolipoproteína E (p. ej., tras unirse al recubrimiento polisorb-80 de las nanopartículas), glutatión, proteína de unión a la vitamina D, proteína de unión al retinol/vitamina A, proteína portadora plasmática de la cobalamina/vitamina B12 o transcobalamina-B12.

Portadores

- 15 Los ligandos en los conjugados de la invención pueden estar conjugados con un portador farmacéuticamente aceptable que comprenda los agentes antivíricos. En tales conjugados, los agentes antivíricos pueden, p. ej., estar encapsulados en nanorrecipientes tales como nanopartículas, liposomas o nanogeles, por lo que preferentemente el ligando se conjuga uniéndolo a un nanorrecipiente de este tipo. Tal conjugación con el nanorrecipiente puede ser o bien directa o bien a través de cualquiera de los agentes de conjugación poliméricos conocidos tales como la esfingomielina, polietilenglicol (PEG) u otros polímeros orgánicos. En la patente de los EE. UU. N.º 6.372.250 se describen los detalles de la producción de tales composiciones farmacéuticas que comprenden los liposomas dirigidos (PEG). Por tanto, en una realización preferida, un conjugado de acuerdo con la invención es un conjugado donde el portador farmacéuticamente aceptable comprende al menos uno de los siguientes: una proteína portadora, un nanorrecipiente, un liposoma, un sistema poliplex, un sistema lipoplex y polietilenglicol.

- 25 En conjugados en los que el agente antivírico comprende un poli- u oligonucleótido, el portador farmacéuticamente aceptable es preferentemente un sistema lipoplex que comprende al menos uno de los siguientes: lípidos catiónicos o lípidos anfóteros (tal como se detalla en el documento WO2002/066012), o un sistema poliplex que comprende al menos uno de los siguientes: poli-L-lisina, poli-L-ornitina, polietilenimina y poliamidoamina. Hay dos grandes tipos de sistemas de suministro no víricos para el suministro intracelular de fármacos antivíricos basados en ácidos nucleicos (como vacunas de ADN, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, ADN catalítico (ADNzimas) o moléculas de ARN, ARNip o plásmidos que los codifican), que comprenden los sistemas lipoplex (liposomas catiónicos que contienen ADN) y sistemas poliplex (ADN unido a un polímero catiónico). En una realización preferida, el portador farmacéuticamente aceptable es un sistema lipoplex o un sistema poliplex. Además, el portador farmacéuticamente aceptable puede además comprender, preferentemente, un conjugado proteico, polietilenglicol (PEGilación), una nanopartícula o un liposoma. Los sistemas poliplex comprenden polímeros catiónicos tales como poli-L-lisina (PLL), poli-L-ornitina (POL), polietilenimina (PEI), poliamidoamina (PAM) o combinaciones de estos con ADN. Los sistemas policatiónicos entran en las células principalmente por endocitosis de fase fluida o endocitosis mediada por adsorción. Los polímeros catiónicos, incluida la PEI, tienen la capacidad de condensar el ADN y desestabilizar el potencial de membrana. Además, se ha demostrado que el suministro del plásmido por los sistemas poliplex de PEI se podría lograr controlando las propiedades biológicas y fisicoquímicas del complejo. Sin embargo, la eficacia de la transfección y la expresión génica son limitadas en comparación con los sistemas de transducción vírica. Debido a que los sistemas de PEI pueden perturbar las membranas, también pueden causar toxicidad, la cual está correlacionada con el peso molecular y la concentración nuclear del polímero. A este respecto se ha demostrado que la PEI lineal (22 KDa) es más tóxica que la PEI ramificada (25 KDa) y que también está relacionada con la cantidad de PEI utilizada en los sistemas poliplex tal como lo expresa la relación N/P (cantidad de nitrógeno en el polímero en relación con la cantidad de ADN). Otros afirman que los sistemas poliplex de PEI lineal muestran una viabilidad celular mejorada y una mayor eficacia de transfección. Recientemente, se han sintetizado varios derivados de PEI biodegradables con mejores propiedades de transfección y menos tóxicos que la PEI lineal.

- 50 Globalmente, la eficacia de la PEI y probablemente de los sistemas policatiónicos depende en general del peso molecular, la carga catiónica global y el grado de ramificación. Cuando se unen al ADN, otros factores como la cantidad de ADN, el tamaño de partícula y el potencial zeta son características importantes. Además, los sistemas policatiónicos cargados positivamente interactúan fácilmente con las proteínas plasmáticas cargadas negativamente cuando se suministra por vía intravenosa y tienen lugar la opsonización tras la unión a las proteínas sanguíneas que las marcan para su eliminación por parte del sistema reticuloendotelial (SRE). En particular, la formación de agregados da lugar a la incorporación por las células fagocíticas y al atrapamiento por parte de las redes de capilares (principalmente en los pulmones tras la administración intravenosa) lo cual da como resultado un rápido aclaramiento del compartimento plasmático y una transfección deficiente de los órganos/tejidos diana. Sin embargo, la PEGilación puede reducir esto drásticamente. Además, la aplicación de un ligando de internalización/señalización evita la necesidad de utilizar sistemas poliplex con una relación N/P elevada y por tanto una carga positiva global alta y puede, por tanto, evitar muchos problemas asociados con los polímeros catiónicos (tales como toxicidad, unión a los constituyentes sanguíneos).

Los componentes del suero también opsonizan y limpian fácilmente los sistemas lipoplex desnudos mediante mecanismos similares a los empleados para los sistemas poliplex, p. ej., mediante el sistema reticuloendotelial (SRE). Además, aunque los CpGs no metilados de los sistemas lipoplex están enmascarados y previenen una respuesta inmune innata, una vez que están en la circulación general, las proteínas sanguíneas (C3, IgG, lipoproteínas y fibronectina) pueden opsonizar los sistemas lipoplex, al igual que los sistemas poliplex, lo que da como resultado reacciones inflamatorias (mediadas por el TNF alfa, IL-6 e IL-12) en los pulmones y el hígado. Además, se ha detectado la activación del complejo y la activación de las células NK, B y T y los macrófagos y se han relacionado con la dosis inyectada del lipoplex. Además de reduciendo el número de CpGs no metilados, se pueden reducir tales interacciones por la PEGilación de estos sistemas o utilizando agentes inmunosupresores (p. ej., dexametasona). Además, las cinéticas de estos sistemas mejoran considerablemente con la PEGilación que reduce su aclaramiento sistémico e incrementa la eficacia de direccionamiento (mediante la aplicación de ligandos de direccionamiento específicos/selectivos). Es más, la disminución del tamaño de los sistemas lipoplex parece ser un factor clave en su distribución tisular e incorporación celular e incrementa su eficacia de transfección. Generalmente, la distribución tisular y la persistencia de la expresión de los sistemas poliplex y lipoplex depende principalmente, al igual que los fármacos de peso molecular bajo tras la administración parenteral, también de las propiedades farmacocinéticas (aclaramiento, volumen de distribución), la formulación (tamaño, carga, PEGilación, etc.) y la pauta posológica (volumen de bolo elevado, inyección secuencial, infusión constante). Respecto a la pauta posológica es interesante destacar que la inyección secuencial de lipoplexes y ADN plasmídico dio como resultado una expresión mayor pero también minimizó la inducción de citocinas. Además, el suministro en el órgano/tejido diana depende del flujo sanguíneo y de la incorporación por los órganos/tejidos o de la permeabilidad y el equilibrio del aclaramiento de los órganos/tejidos diana y de los que no constituyen una diana. Por tanto, debe determinarse una pauta posológica adecuada, basada en parámetros farmacocinéticos, para optimizar el suministro/direccionamiento a los órganos y tejidos. Además, esto debe armonizarse con las propiedades farmacocinéticas intracelulares.

Las propiedades farmacocinéticas intracelulares (distribución, eliminación) de los sistemas poliplex y lipoplex tras la incorporación celular en un asunto importante. Además de la incorporación mediada por un receptor, la internalización (a través de la vía dependiente de las caveolas o de clatrina) de sistemas de PEI particularmente no direccionados parece depender tanto de la línea celular como del tipo del componente poliplex-PEI (PEI lineal vs PEI ramificado). Frecuentemente, los sistemas de este tipo acaban en endosomas tardíos, por tanto es necesario que escapen de estos orgánulos para acceder al citoplasma y alcanzar en última instancia el núcleo. Los sistemas catiónicos como los sistemas poliplex pueden escapar de los endosomas/lisosomas debido a su capacidad de tamponar el pH y causar un hinchamiento osmótico de estos orgánulos de acuerdo con la teoría denominada "escape mediado por la esponja de protones". Sin embargo, parece que una pequeña fracción de los sistemas internalizados escapa al citoplasma y que una gran parte permanece en los endosomas/lisosomas y se degrada. No obstante, se ha demostrado que la incorporación de lípidos fusógenicos o péptidos catiónicos (melitina) en estos sistemas podría aumentar el escape de los endosomas.

Una vez en el citosol, las nucleasas pueden degradar fácilmente los plásmidos lineales mientras que los plásmidos circulares son mucho más estables. Por tanto, se prefieren las moléculas de ácido (desoxi)nucleico circulares. En particular, las nucleasas sensibles al calcio parecen ser las responsables de esta degradación. En última instancia, los plásmidos han de transportarse al núcleo a través del complejo del poro nuclear (NPC, por sus siglas en inglés) el cual forma un canal acuoso a través de la envoltura nuclear y se estima que aproximadamente un 0,1% de los plásmidos son capaces de acceder al núcleo desde el citosol. Las moléculas menores de 40 KDa pueden pasar de forma pasiva el NPC mientras que las moléculas mayores (> 60 KDa) necesitan una señal de localización nuclear específica (NLS, por sus siglas en inglés) para ser transportadas de manera activa a través del NPC, lo que permite el transporte de moléculas de hasta 25-50 MDa. De hecho, se ha demostrado que el acoplamiento de un NLS a los plásmidos aumenta la acumulación nuclear y la expresión del ADN plasmídico. Por tanto, se acopla preferentemente un NLS con cualquier constructo de expresión para su uso en los conjugados de la invención.

En la técnica se conocen una gran variedad de métodos para la conjugación de ligandos con los agentes o portadores. Tales métodos son descritos, p. ej., por Hermanson (1996, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press), en los documentos de los EE.UU. 6.180.084 y EE.UU. 6.264.914 e incluyen, p. ej., métodos utilizados para unir haptenos a proteínas portadoras tal como se emplean de manera rutinaria en la inmunología aplicada (remítase a Harlow y Lane, 1988, "Antibodies: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Es algo reconocido que, en algunos casos, un ligando o agente puede perder eficacia o funcionalidad tras la conjugación dependiendo p. ej., del procedimiento de conjugación o del grupo químico utilizado en este. Sin embargo, dada la gran variedad de métodos de conjugación el experto será capaz de encontrar un método de conjugación que no afecte, o que afecte en menor grado, a la eficacia o funcionalidad de las entidades que se van a conjugar. Los métodos adecuados para la conjugación de un ligando con un agente o portador incluyen, p. ej., la conjugación con carbodiimida (Bauminger y Wilchek, 1980, *Meth. Enzymol.* 70: 151-159). De forma alternativa, se puede acoplar un agente o portador con un ligando tal como lo describen Nagy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7269-7273 (1996); y Nagy *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:1794-1799 (1998). Otros métodos de conjugación que se pueden emplear de manera adecuada son, p. ej., oxidación con peryodato sódico seguido de alquilación reductora de los reactivos apropiados y reticulación con glutaraldehído. Se puede aplicar un método especialmente favorable de conjugación cuando tanto el ligando como el agente o portador son (poli)péptidos. En tales casos, las

dos entidades se pueden sintetizar como una única cadena (poli)peptídica que comprenda las secuencias aminoacídicas tanto del ligando como del portador o agente peptídico. Además del enlace covalente, en un conjugado de acuerdo con la invención el agente o portador también puede conjugarse directamente con la molécula que actúa de ligando por interacción proteína-proteína específica o no específica, enlace no covalente y/o enlace químico de coordinación, en el que la conjugación se puede efectuar opcionalmente a través de un espaciador o conector que se une al agente y al ligando.

En otro aspecto, la invención describe un conjugado de la invención tal como se ha definido anteriormente, para usar en el tratamiento y/o prevención de una infección vírica. Se utiliza un conjugado de la invención en la producción de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una infección vírica. De manera similar, se describen métodos para el tratamiento y/o prevención de una infección vírica, donde se administra una dosis eficaz de un conjugado de la invención a un sujeto que lo necesite. El sujeto que necesita el tratamiento o prevención de una infección vírica puede ser un vertebrado, mamífero o, preferentemente, un ser humano.

Infecciones víricas y afecciones asociadas

Los siguientes epígrafes proporcionan una descripción de varios virus, enfermedades víricas y afecciones asociadas que se pueden tratar y/o prevenir en varias realizaciones con los conjugados de la invención que comprenden un agente antivírico activo intracelularmente. Muchos virus codifican sus propias ARN/ADN polimerasas u otras proteínas o enzimas necesarias para su replicación o función, tales como proteasas, enzimas que catalizan la adición de la caperuza al ARNm, neuramididasas, ribonucleasas y cinasas y como tal, son susceptibles de ser tratadas con agentes antivíricos activos intracelularmente. Además, los más de 100 virus que son capaces de provocar encefalitis vírica aguda requieren especialmente tratamiento con agentes antivíricos activos intracelularmente que pueden alcanzar las poblaciones celulares en el SNC, en y a través de la barrera hematoencefálica. Algunos ejemplos muy conocidos de virus de este tipo son los arbovirus (*flaviviridae*, *bunyaviridae*, *togaviridae*), enterovirus, el virus de las paperas, el virus de la gripe, el virus de la rabia y herpesvirus como el virus de la varicela, el virus del herpes simple y el citomegalovirus. Por tanto, en una realización preferida, los conjugados se usan en métodos para el tratamiento y/o prevención de la infección vírica de células del SNC. La infección vírica del SNC puede, p. ej., ser al menos una de las siguientes: meningitis vírica, encefalitis, encefalomiелitis y leucoencefalitis multifocal progresiva.

En una realización preferida, la infección vírica está causada por un arbovirus seleccionado de una de las siguientes familias: *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* y *Togaviridae*. Los flavivirus son virus con ARN monocatenario codificante positivo con envoltura que pertenecen, junto con los hepaci- y pestivirus (virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la diarrea vírica bovina (VDVB), virus de la fiebre porcina clásica (VFPC), virus de la enfermedad de la frontera (VEF), y virus de la hepatitis G/virus GB C (VHG/VGB-C), a la familia de los *Flaviviridae*. El género *Flavivirus* contiene (i) virus que son transmitidos por mosquitos o garrapatas (transmitidos por artrópodos) y (ii) virus sin vector conocido (NKV, por sus siglas en inglés), como el virus Modoc y el virus de la leucoencefalitis del myotis de Montana.

Uno de los flavivirus más importantes que causa enfermedades en el hombre es el virus dengue (DENV, por sus siglas en inglés) que causa varios cientos de miles de casos de fiebre hemorrágica del dengue (FHD) y el síndrome del choque por dengue (SCD), el último de los cuales presenta una tasa global de letalidad de aproximadamente un 5%.

El virus de la fiebre amarilla (YFV, por sus siglas en inglés) es, a pesar de la disponibilidad de una vacuna sumamente eficaz, todavía una de las principales causas de la fiebre hemorrágica vírica (VHF, por sus siglas en inglés) en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud ha estimado que hay 200 000 casos anuales de YF, incluidas 30 000 muertes, el 90% de las cuales ocurren en África.

La encefalitis japonesa (JE, por sus siglas en inglés), una infección arbovírica transmitida por un mosquito, es la principal causa de encefalitis vírica en Asia. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, cada año se informa de aproximadamente 50 000 casos de JE epidémicos y esporádicos. La infección provoca una elevada mortalidad (30%) y aproximadamente la mitad de los supervivientes desarrollan secuelas neurológicas de larga duración.

El virus de la encefalitis del valle de Murray (MVEV, por sus siglas en inglés) y los virus de Yaounde, Usutu, Stratford, Rocio, Kunjin, Koutango, Cacipacore, Alfuy, de la encefalitis de S. Luis y del Nilo occidental pertenecen todos ellos al complejo antigénico de la JE y causan encefalitis en el hombre. Aunque la última gran epidemia causada por MVEV tuvo lugar en 1974, se informa de nuevos casos de infección por MVEV de manera regular, especialmente en Australia occidental. En 1996, se informó de un brote de la encefalitis del Nilo occidental (WN, por sus siglas en inglés) con 373 casos y 17 muertes en Rumanía. En 1999, la enfermedad apareció por primera vez en el noreste de los Estados Unidos y ha continuado extendiéndose por todo Estados Unidos y Canadá. En 2003, se informó de 9388 casos en humanos de fiebre del WN, meningo(encefalitis) del WN y 246 muertes en los EE. UU. A comienzos de 2007, el número total de muertes ya ascendía a 934. En los últimos años, también han tenido lugar brotes de encefalitis del WN en la Rusia meridional e Israel. El virus de la encefalitis de S. Luis (SLEV, por sus siglas en inglés) es endémico en el oeste de los Estados Unidos y es responsable de una enfermedad neurológica grave.

Otros flavivirus importantes que causan encefalitis son también responsables de secuelas neurológicas y tasas de mortalidad elevadas, incluido el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV, por sus siglas en inglés) el cual se cree que causa anualmente al menos 11 000 casos en humanos de encefalitis en Rusia y aproximadamente 3000 casos en el resto de Europa. Algunos virus relacionados dentro del mismo grupo son el virus del mal del brinco ("looping ill"; LIV, por sus siglas en inglés), el virus Langat (LGTV, por sus siglas en inglés), el virus de la encefalitis rusa de la primavera-verano (RSSEV, por sus siglas en inglés) y el virus Powassan (POWV, por sus siglas en inglés). Al LIV se le conoce principalmente como una enfermedad ovina, pero también ha demostrado ser capaz de infectar y causar la enfermedad en ciervos, ganado, cabras, lagópodo escocés y ocasionalmente en el hombre. LGTV y POWV también causan encefalitis en humanos pero, al igual que en el caso del LIV, raramente a escala epidémica. Otros tres virus del mismo grupo, el virus de la fiebre hemorrágica de Omsk (OHFV, por sus siglas en inglés), el virus de la enfermedad de la selva de Kyasanur (KFDV, por sus siglas en inglés) y el virus Alkhurma (ALKV, por sus siglas en inglés), están estrechamente relacionados con virus complejos TBE y provocan antes fiebres hemorrágicas letales que encefalitis.

Otros *flaviviridae* incluyen el virus de Gadgets Gully (GGYV, por sus siglas en inglés), virus de Kadam (KADV, por sus siglas en inglés), virus Royal Farm (RFV, por sus siglas en inglés), virus de Meaban (MEAV, por sus siglas en inglés), virus del arrecife de Saumarez (SREV, por sus siglas en inglés), virus de Tyuleniy (TYUV, por sus siglas en inglés), virus de Aroa (AROAV, por sus siglas en inglés), virus de Kedougou (KEDV, por sus siglas en inglés), virus Cacipacore (CPCV, por sus siglas en inglés), virus de Koutango (KOUV, por sus siglas en inglés), virus de Usutu (USUV, por sus siglas en inglés), virus de Yaounde (YAOV, por sus siglas en inglés), virus Kokobera (KOKV, por sus siglas en inglés), virus Bagaza (BAGV, por sus siglas en inglés), virus de Ilheus (ILHV, por sus siglas en inglés), virus de la meningoencefalomielitis de Israel y Turquía (ITV, por sus siglas en inglés), virus de Ntaya (NTAV, por sus siglas en inglés), virus de Tembusu (TMUV, por sus siglas en inglés), virus Zika (ZIKV, por sus siglas en inglés), virus de Banzi (BANV, por sus siglas en inglés), virus de Bouboui (BOUV, por sus siglas en inglés), virus de Edge Hill (EHV, por sus siglas en inglés), virus de Jugra (JUGV, por sus siglas en inglés), virus de Saboya (SABV, por sus siglas en inglés), virus del Sepik (SEPV, por sus siglas en inglés), virus S de Uganda (UGSV, por sus siglas en inglés), virus de Wesselsbron (WESSV, por sus siglas en inglés), virus del murciélago de Entebbe (ENTV, por sus siglas en inglés), virus de Yokose (YOKV, por sus siglas en inglés), virus de Apoi (APOIV, por sus siglas en inglés), virus Cowbone Ridge (CRV, por sus siglas en inglés), virus de Jutiapa (JUTV, por sus siglas en inglés), virus de Sal Vieja (SVV, por sus siglas en inglés), virus de San Perlita (SPV, por sus siglas en inglés), virus del murciélago de Bukalasa (BBV, por sus siglas en inglés), virus de la isla Carey (CIV, por sus siglas en inglés), virus del murciélago de Dakar (DBV, por sus siglas en inglés), virus del murciélago de Phnom Penh (PPBV, por sus siglas en inglés) y virus de Río Bravo (RBV, por sus siglas en inglés).

La familia *Bunyaviridae* incluye los virus de la fiebre causada por tábanos, la fiebre del valle de Rift, fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (CCHF, por sus siglas en inglés), La Crosse (LAC, por sus siglas en inglés), hanta (que causa la fiebre hemorrágica coreana), Punta Toro, Cañón de Jamestown (JTC, por sus siglas en inglés), encefalitis de California, Trivittatus, Keystone, de la liebre americana, Slough, Melao, Oropouche, Potosí y San Angelo. La CCHF es una zoonosis transmitida por garrapatas que da como resultado brotes graves en humanos pero que no es patogénica para rumiantes, su hospedador amplificador. Aunque el virus CCHF no es patogénico para los animales, se sabe que la enfermedad es una de las VHF más importantes debido a su elevada tasa de letalidad (10-40%) y su potencial para una transmisión nosocomial. La CCHF es endémica en África, los Balcanes, Oriente Medio y en Asia, al sur de una latitud norte de 50°, el límite del reservorio de su garrapata, el género *Hyalomma*. Cada año aumentan los informes de brotes limitados y casos esporádicos en humanos. Recientemente, los brotes de CCHF en Afganistán (2001-2006), Irán (2001), Kazajistán (2005), Kosovo (2001), Mauritania (2002-2003), Pakistán (2001-2006), Rusia (2006), Senegal (2004, con un caso en humanos exportado a Francia), Sudáfrica (2006), Sudán (2004), Tajikistán (2002-2004) y Turquía (2003-2006) han atraído la atención internacional sobre este problema emergente. En estas áreas endémicas, los cambios ecológicos, la pobreza e inestabilidad social, el equipamiento médico insuficiente junto con la ausencia de precauciones estándar del control de la infección han contribuido todos ellos a un aumento en la transmisión del virus de CCHF en su entorno natural, en la comunidad o en instalaciones hospitalarias. La ausencia de una terapia económica y accesible todavía limita las acciones para el control de los brotes. En la actualidad, no hay una terapia antivírica específica para la CCHF. Sin embargo, se ha demostrado que la ribavirina inhibe la replicación vírica *in vitro* en células Vero y reduce el tiempo medio para la muerte en un modelo de la CCHF en ratones lactantes. Además, se han publicado varios informes de casos que sugieren que la ribavirina oral o intravenosa es eficaz para el tratamiento de las infecciones de la CCHF. Todos los informes publicados mostraron un claro beneficio en pacientes con CCHF confirmado tratados con ribavirina (administración oral e intravenosa). No hubo ni mortalidad ni efectos secundarios importantes asociados al tratamiento con ribavirina. Los resultados de todos estos estudios están limitados por su diseño y tamaño de muestra.

La fiebre hemorrágica con síndrome renal (HFRS, por sus siglas en inglés) es un grupo de enfermedades clínicamente similares causadas por hantavirus de la familia de virus *Bunyaviridae*. La HFRS incluye enfermedades tales como la fiebre hemorrágica coreana, la fiebre hemorrágica epidémica y la nefropatía epidémica. Los virus que causan la HFRS incluyen los siguientes: Hantaan, de Dobrava-Belgrado, de Seúl y de Pumala. La HFRS está presente en todo el mundo. El virus Hantaan está ampliamente distribuido por Asia oriental, particularmente China, Rusia y en la Corea peninsular. El virus de Pumala se halla en Escandinavia, Europa occidental y Rusia. El virus de

Dobrava se halla principalmente en los Balcanes, y el virus de Seúl se halla por todo el mundo. La ribavirina ha demostrado poseer un efecto antihantavírico tanto *in vitro* como *in vivo*. En China se usa la ribavirina con frecuencia en el tratamiento de la HFRS y los ensayos clínicos han mostrado que la terapia con ribavirina puede reducir significativamente la mortalidad asociada a la HFRS. En la República Popular China se llevó a cabo un ensayo clínico prospectivo, aleatorizado, con ocultación doble, de cohortes, controlado con placebo, de ribavirina intravenosa en 242 pacientes con fiebre hemorrágica con síndrome renal (HFRS) confirmada serológicamente. La mortalidad se redujo significativamente (una reducción de siete veces en el riesgo) entre los pacientes tratados con ribavirina. La terapia con ribavirina dio como resultado una reducción significativa del riesgo de entrar en la fase oligúrica y sufrir hemorragias. El único efecto secundario relacionado con la ribavirina fue una anemia totalmente reversible tras el término de la terapia. Diferentes investigadores chinos también demostraron la eficacia de la terapia con ribavirina para la HFRS.

Aquellos virus que son particularmente considerados en la familia *Togaviridae* incluyen los virus de la encefalomyelitis equina venezolana (EEV), la encefalitis equina del este (EEE) y la encefalitis equina del oeste (EEO).

Otros virus que requerirían tratamiento con agentes antivíricos activos sobre el SNC y/o intracelularmente son los *arenaviridae* (virus Pichindé, virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV, por sus siglas en inglés), virus de Lassa (que causa la fiebre de Lassa) y la fiebre hemorrágica argentina (FHA)), *paramyxoviridae* (virus respiratorio sincitial (VRS), virus del sarampión (que causa panencefalitis esclerosante subaguda), virus de las paperas), *herpesviridae* (varicela-zóster (VZV), virus del herpes simple (VHS), virus 6 del herpes humano (VHH-6), citomegalovirus (CMV) y virus de Epstein-Barr (VEB)), *ortomyxoviridae* (virus A y B de la gripe), *picornaviridae* (enterovirus (3 poliovirus (PV), 28 ecovirus (ECV), 23 coxsackievirus del grupo A y 6 del grupo B (CVA y CVB respectivamente) y el virus de Theiler), y 4 enterovirus numerados), *poxviridae* (virus de la viruela, de la viruela de las vacas (CV, por sus siglas en inglés), de la viruela del camello, de la viruela del mono y virus vacuna), *reoviridae* (virus de la lengua azul, rotavirus, rotavirus de simios (SA11) y el virus de la fiebre por garrapatas de Colorado (CTFV, por su siglas en inglés)), *polyomaviridae* (virus JC (JCV, por sus siglas en inglés, que causa LMP en paciente inmunocomprometidos), virus BK (BKV, por sus siglas en inglés) y el virus 40 de simios (SV40, por sus siglas en inglés)), *filoviridae* (virus de Marburgo, virus Ébola), *rhabdoviridae* (rabia), *retroviridae* (virus linfotrópico humano de células T (VLHT, tipos I y II), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH, tipos I y II)), *coronaviridae* (coronavirus (que causan SARS), torovirus), *adenoviridae* e *iridoviridae*.

La fiebre hemorrágica por el virus de Lassa es una enfermedad aguda que ocurre en el oeste de África. El virus es un virus con ARN monocatenario que pertenece a la familia de virus *Arenaviridae*. Se sabe que la fiebre de Lassa es endémica en Guinea (Conakry), Liberia, Sierra Leona y partes de Nigeria, pero probablemente también existe en otros países del oeste de África. Algunos estudios indican que cada año tienen lugar de 300 000 a 500 000 casos de fiebre de Lassa y 5000 muertes en todo el oeste de África. La tasa de letalidad global está comprendida entre el 1%-2% en la comunidad, hasta un 15%-25% entre los pacientes hospitalizados y hasta un 50%-60% durante los brotes. Se ha informado de sordera en más de un 25%-30% de los pacientes que se han recuperado. En los casos mortales, la muerte normalmente ocurre en los 14 días posteriores al inicio. La enfermedad es especialmente grave al final del embarazo, donde, durante el tercer trimestre, la muerte materna o la pérdida del feto ocurren en más del 80% de los casos. En un estudio prospectivo de la fiebre de Lassa en Sierra Leona, se evaluó la eficacia de ribavirina (administración oral e intravenosa) y del plasma de pacientes convalecientes del virus de Lassa para el tratamiento de la fiebre de Lassa. Se concluyó que la ribavirina era eficaz en el tratamiento de la fiebre de Lassa y que debería emplearse en cualquier momento de la enfermedad, aunque era preferible durante los primeros 6 días tras el inicio.

La fiebre hemorrágica argentina (FHA) es transmitida por roedores y causada por el virus Junin, un miembro de la familia *Arenaviridae*. Desde que la enfermedad se reconoció por primera vez en 1955, se han notificado brotes anuales sin interrupción, con más de 24 000 casos notificados en 1993. El área endemoepidémica de la enfermedad está localizada en la pampa húmeda, la tierra de cultivo más fértil de Argentina. La FHA es una enfermedad vírica aguda grave caracterizada por un síndrome febril con alteraciones cardiovasculares, renales, neurológicas y hematológicas. Sin tratamiento, la tasa de letalidad es de un 15-30%. Desde 1992 está disponible una vacuna viva atenuada contra la FHA. La vacuna se ha empleado en poblaciones de adultos de alto riesgo con una reducción significativa en la incidencia de la enfermedad. Sin embargo, incluso con una vacuna eficaz, continúan ocurriendo casos esporádicos y brotes. El tratamiento temprano con plasma de pacientes convalecientes de FHA es extremadamente eficaz y reduce la mortalidad a un 1%. Sin embargo, este tratamiento solamente es efectivo si se administra durante el período de los 8 primeros días tras el inicio de los síntomas. Además, la terapia con plasma conlleva el riesgo de enfermedades transmitidas por transfusiones y la aparición de un síndrome neurológico tardío (SNT) que ha ocurrido en el 10% de los supervivientes tratados. Tan solo hay unos pocos estudios en humanos y animales sobre la eficacia clínica de la ribavirina en el tratamiento de los *Arenaviridae* del Nuevo Mundo. Estos datos clínicos limitados indican un beneficio claro del tratamiento con ribavirina, con una buena tolerancia y seguridad del fármaco.

Dado el amplio espectro de actividad antivírica de los fármacos comercializados en la actualidad como ribavirina (con una actividad establecida contra, p. ej., *flaviviridae*, *rhabdoviridae*, *togaviridae*, *bunyaviridae*, *arenaviridae*, *filoviridae*, *poxviridae*, *reoviridae*, *picornaviridae* y *ortomyxoviridae*) y cidofovir (con una actividad establecida contra,

p. ej., *herpesviridae*, *polyomaviridae* y *poxviridae*), estos son fármacos muy adecuados para un perfil de toxicidad y un suministro dirigido mejorado, especialmente porque mejoran la tasa de disponibilidad en el SNC y/o intracelular. Esto también es cierto para los fármacos antivíricos más específicos, y ampliamente utilizados, aciclovir y ganciclovir (establecidos selectivamente contra los *herpesviridae*) y zanamivir y oseltamivir (establecidos selectivamente contra los *paramyxoviridae*).

En una realización, la infección vírica causa afecciones no crónicas, tales como enfermedades subagudas inducidas por virus como la meningitis, encefalitis, encefalomiелitis, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), retinitis, nefritis, gastroenteritis, bronquiолitis, pneumonitis, síndrome respiratorio agudo grave (SARS, por sus siglas en inglés), fiebres hemorrágicas y similares. En otra realización, la infección vírica causa un trastorno del sistema nervioso central (SNC) o neurológico. A menudo los tratamientos tradicionales de las afecciones no crónicas tales como las enfermedades subagudas inducidas por virus como la meningitis, encefalitis, encefalomiелitis, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), retinitis, nefritis, gastroenteritis, bronquiолitis, pneumonitis, síndrome respiratorio agudo grave (SARS, por sus siglas en inglés), fiebres hemorrágicas y similares, no se aplican a tiempo. Además, tales tratamientos tradicionales están limitados normalmente por la toxicidad, donde los efectos secundarios más frecuentes consisten en el desarrollo de anemia hemolítica o daño renal, que requieren o bien una reducción de la dosis o la retirada en ciertos pacientes, con la consiguiente reducción en la respuesta a la terapia. En una realización preferida, el trastorno es una enfermedad aguda o subaguda. En una realización más preferida el trastorno es encefalitis vírica.

Dado el distinto mecanismo de acción, los agentes antivíricos activos intracelularmente se pueden coadministrar/tratar eficazmente con otras clases de medicaciones antivíricas tales como interferones de tipo I, o inductores de estos, inhibidores de la fusión y entrada vírica, programas de vacunación, o con terapias antiinflamatorias como con glucocorticoides y similares.

El conjugado CRM 197-RBV, el liposoma CRM 197-PEG que comprende RBV o el sistema poliplex CRM 197-PEG-PEI anti-JEV ADNzimas poliplex se pueden coadministrar con dexametasona o interferón alfa-2a o ambos.

Direccionamiento a y/o a través de las barreras hematotísulares

En otro aspecto, se proporciona un método de suministro farmacológico dirigido de una cantidad eficaz de un agente antivírico, o un portador farmacéuticamente aceptable que comprende un agente antivírico, a un sitio diana que está protegido por una barrera hematotísular específica tal como, p. ej., el SNC, la barrera hematoencefálica (BHE), la retina y los testículos, donde: a) el agente antivírico o el portador farmacéuticamente aceptable se conjuga con un ligando que facilita la unión específica a y la internalización mediante un receptor de incorporación por internalización del sitio diana, de este modo se forma el conjugado como se ha definido anteriormente; y b) el agente antivírico se suministra al sitio diana en un período de tiempo comprendido entre aproximadamente el día 1 y aproximadamente el día 5 tras la administración a una persona que lo necesita. En una realización preferida, la integridad de la barrera hematotísular, p. ej., la barrera hematoencefálica no se ve afectada en el método por la administración de agentes que afectan a la integridad de la barrera hematotísular. En otra realización preferida, el período de tiempo está comprendido entre aproximadamente el día 1 y aproximadamente el día 7, más preferentemente entre aproximadamente el día 1 y aproximadamente el día 10, incluso más preferentemente entre aproximadamente el día 1 y aproximadamente el día 14, todavía más preferentemente entre aproximadamente el día 1 y aproximadamente el día 21.

Los siguientes epígrafes se refieren a varias realizaciones de la invención relativas al direccionamiento activo a sitios diana protegidos por una barrera hematotísular específica como, p. ej., el SNC, la barrera hematoencefálica (BHE), la retina y los testículos, mediante transcitosis mediada por receptor. En una realización preferida de la invención, el receptor que media al menos uno de los siguientes procesos: endocitosis y transcitosis, está localizado en los capilares (la cara luminal de) del cerebro. En general, sin que ello suponga ceñirse a ninguna teoría, la transcitosis mediada por receptor tiene lugar en tres pasos: endocitosis mediada por el receptor del agente en la cara (sanguínea) luminal, movimiento a través del citoplasma endotelial y exocitosis del fármaco en la cara (cerebral) abluminal del endotelio capilar cerebral. Tras la internalización del receptor-ligando, se forman vesículas recubiertas de clatrina, las cuales tienen aproximadamente 120 nm de diámetro. Estas vesículas pueden transportar su contenido al otro extremo de la célula o seguir una ruta que da lugar a la degradación proteica. De hecho, se han identificado al menos dos rutas importantes para la degradación proteica, que incluyen la ruta ubiquitina-proteasoma y la lisosomal. Por tanto, para escapar del sistema endosomal-lisosomal, se han aplicado mecanismos que aseguran la liberación del fármaco en el citosol. Estos incluyen la aplicación de moléculas catiónicas o liposomas sensibles al pH. La toxina diftérica que también es aplicable como un ligando de direccionamiento, y que se trata más adelante, posee un mecanismo intrínseco para escapar de los lisosomas. Sin embargo, con o sin aplicación de mecanismos para escapar de los lisosomas, se ha demostrado que el suministro proteico en el cerebro es eficaz. Por tanto, la transcitosis mediada por el receptor permite el direccionamiento específico de moléculas farmacológicas mayores o partículas portadoras del fármaco (tales como liposomas, sistemas poliméricos, nanopartículas) al cerebro. En una realización preferida, al menos uno de los receptores que media al menos uno de los siguientes procesos: endocitosis y transcitosis, el ligando y el portador farmacéuticamente aceptable se seleccionan para evitar la degradación lisosomal del agente antivírico en la célula.

Terapia génica

Algunos aspectos de la invención se refieren al uso de vectores de expresión que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un agente antivírico que comprende un oligo- o polinucleótido tal como se ha definido anteriormente, donde el vector es un vector que es adecuado para la terapia génica. Los vectores adecuados para la terapia génica se describen en Anderson 1998, *Nature* 392: 25-30; Walther y Stein, 2000, *Drugs* 60: 249-71; Kay *et al.*, 2001, *Nat. Med.* 7: 33-40; Russell, 2000, *J. Gen. Virol.* 81: 2573-604; Amado y Chen, 1999, *Science* 285: 674-6; Federico, 1999, *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 448-53; Vigna y Naldini, 2000, *J. Gene Med.* 2: 308-16; Marin *et al.*, 1997, *Mol. Med. Today* 3: 396-403; Peng y Russell, 1999, *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 454-7; Sommerfelt, 1999, *J. Gen. Virol.* 80: 3049-64; Reiser, 2000, *Gene Ther.* 7: 910-3; y las referencias citadas en ellos. Los vectores de terapia génica especialmente adecuados incluyen los vectores adenovíricos y asociados a adenovirus (AAV). Estos vectores infectan a un amplio número de tipos celulares en división y que no están en división. Además, los vectores adenovíricos son capaces de dar lugar a niveles elevados de expresión del transgen. Sin embargo, debido a la naturaleza episomal de los vectores adenovíricos y AAV tras la entrada en la célula, estos vectores víricos son más adecuados para las aplicaciones terapéuticas que requieren únicamente una expresión transitoria del transgen (Russell, 2000, *J. Gen. Virol.* 81:2573-2604) tal como se han indicado anteriormente. Los vectores adenovíricos preferidos se modifican para reducir la respuesta del hospedador tal como indica la revisión de Russell (2000, *supra*).

Generalmente, los vectores de terapia génica serán como los vectores de expresión descritos anteriormente en el sentido de que comprenden la secuencia de nucleótidos que codifica el agente antivírico que se ha de expresar, mediante lo cual la secuencia de nucleótidos está ligada operablemente a las secuencias reguladoras apropiadas tal como se ha indicado anteriormente. Tal secuencia reguladora comprenderá al menos una secuencia promotora. Tal como se usa en la presente, el término "promotor" se refiere a un fragmento de un ácido nucleico cuya función es controlar la transcripción de uno o más genes, localizados en dirección 5' con respecto a la dirección de transcripción del sitio de iniciación transcripcional del gen, y se identifica estructuralmente por la presencia de un sitio de unión para una ARN polimerasa dependiente de ADN, sitios de iniciación transcripcionales y cualesquiera otras secuencias de ADN, incluidos, pero sin carácter limitante, sitios de unión del factor transcripcional, sitios de unión de una proteína activadora y represora y cualesquiera otras secuencias de nucleótidos que un experto en la técnica sepa que actúan directa o indirectamente para regular el grado de transcripción por parte del promotor. Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo en la mayoría de las condiciones fisiológicas y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que está regulado dependiendo de las condiciones fisiológicas o de desarrollo. Un promotor "específico de un tejido" únicamente es activo en tipos específicos de tejido/células diferenciadas. Los promotores adecuados para la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de los vectores de terapia génica incluyen, p. ej., el promotor temprano intermedio del citomegalovirus (CMV), promotores de repeticiones terminales largas (LTR, por sus siglas en inglés) víricas, tales como aquellos del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV, por sus siglas en inglés), el virus del sarcoma de Rous, o VLHT-1, el promotor temprano del virus 40 de simios (SV 40) y el promotor timidina-cinasa del virus del herpes simple.

Se han descrito varios sistemas de promotores inducibles que pueden ser inducidos mediante la administración de compuestos inorgánicos u orgánicos de bajo peso molecular. Tales promotores inducibles incluyen aquellos controlados por metales pesados, tales como el promotor de metalotionina (Brinster *et al.* 1982 *Nature* 296: 39-42; Mayo *et al.* 1982 *Cell* 29: 99-108), RU-486 (un antagonista de la progesterona) (Wang *et al.* 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8180-8184), esteroides (Mader y White, 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5603-5607), tetraciclina (Gossen y Bujard 1992 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551; patente de los EE. UU. N.º 5.464.758; Furth *et al.* 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9302-9306; Howe *et al.* 1995 *J. Biol. Chem.* 270: 14168-14174; Resnitzky *et al.* 1994 *Mol. Cell. Biol.* 14: 1669-1679; Shockett *et al.* 1995 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6522-6526) y el sistema tTAER que está basado en el transactivador multiquimérico compuesto por un polipéptido tetR, como dominio activador del VP16, y un dominio de unión al ligando de un receptor de estrógeno (Yee *et al.*, 2002, documento de los EE.UU. 6.432.705).

El vector de terapia génica puede comprender opcionalmente una segunda secuencia de nucleótidos, o una o más secuencias de nucleótidos adicionales que codifican una segunda proteína o más proteínas. La segunda proteína o más proteínas pueden ser una proteína marcadora (seleccionable) que permita la identificación, selección y/o cribado de células que contienen el constructo de expresión. Algunas proteínas marcadoras adecuadas para este propósito son, p. ej., proteínas fluorescentes tales como, p. ej., la GFP verde, y los genes marcadores seleccionables de la timidina-cinasa del VHS (para la selección en un medio HAT), higromicina B-fosfotransferasa bacteriana (para la selección con higromicina B), la Tn5 aminoglucósido-fosfotransferasa (para la selección con G418) y la dihidrofolato-reductasa (DFHR, por sus siglas en inglés) (para la selección con metotrexato), CD20, el gen del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad. Se proporcionan las fuentes para obtener estos genes marcadores y métodos para su uso en Sambrook y Russel (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

De manera alternativa, la segunda secuencia de nucleótidos o las secuencias de nucleótidos adicionales pueden codificar una proteína que proporcione un mecanismo de seguridad a prueba de fallos que permita curar al sujeto de las células transgénicas, si se considera necesario. Tal secuencia de nucleótidos, a menudo denominada gen suicida, codifica una proteína que es capaz de convertir un profármaco en una sustancia tóxica que sea capaz de

5 exterminar las células transgénicas en las cuales se expresa la proteína. Los ejemplos adecuados de genes suicidas de este tipo incluyen, p. ej., el gen de la citosina-desaminasa de *E. coli* o uno de los genes de la timidina-cinasa del virus del herpes simple, citomegalovirus y virus de varicela-zóster, en cuyo caso puede emplearse ganciclovir como profármaco para exterminar las células transgénicas IL-10 en el sujeto (remítase, p. ej., a Clair *et al.*, 1987, *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:844-849). Los vectores de la terapia génica se formulan preferentemente en una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable tal como se define más adelante.

Anticuerpos

10 Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden ser una parte componente de los conjugados de la invención. Preferentemente, el anticuerpo, o el fragmento de este, es un anticuerpo monoclonal (MAb, por sus siglas en inglés). Se pueden preparar MAb para componentes del complemento utilizando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen el uso de tecnologías de despliegue en fagos, recombinantes, de hibridoma o una combinación de estas. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos monoclonales utilizando técnicas de hibridoma, incluidas aquellas conocidas en la técnica y descritas, por ejemplo, en Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory*

15 *Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). Para tratar humanos, los MAb anti-complemento se utilizarán preferentemente como anticuerpos humanos, humanizados, desimmunizados o quiméricos. Tales anticuerpos pueden reducir la inmunogenicidad y por tanto evitar la respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA, por sus siglas en inglés). Es preferible que el anticuerpo sea la IgG4, IgG2 u otra IgG mutada genéticamente o IgM la cual no aumenta la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (S. M. Canfield y S. L. Morrison, *J. Exp. Med.*, 1991: 173: 1483-1491) y citólisis mediada por el complemento (Y. Xu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1994: 269: 3468-3474; V. L. Pulito *et al.*, *J. Immunol.*, 1996; 156: 2840-2850). Los anticuerpos quiméricos son producidos mediante procesos recombinantes muy conocidos en la técnica y poseen una región variable animal y una región constante humana. Los anticuerpos humanizados tienen un grado mayor de secuencias peptídicas humanas que los anticuerpos quiméricos. En un anticuerpo humanizado, únicamente las regiones que determinan la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), las cuales son responsables de la unión del antígeno y la especificidad, están derivadas de animales y poseen una secuencia de aminoácidos que se corresponde con el anticuerpo animal y sustancialmente todas las porciones restantes de la molécula (excepto, en algunos casos, porciones pequeñas de las regiones estructurales de la región variable) se derivan de humanos y su secuencia de aminoácidos se corresponde con la de un anticuerpo humano. Remítase a L. Riechmann *et al.*, *Nature*, 1988; 332: 323-327; G. Winter, patente de los EE. UU. N.º 5.225.539; C. Queen *et al.* documento de los EE.UU. 5.530.101. Los anticuerpos desimmunizados son anticuerpos en los cuales se han eliminado los epítotos de las células T y B, tal como se describe en el documento WO9852976. Cuando se aplican *in vivo* tienen una inmunogenicidad reducida. Los anticuerpos humanos se pueden obtener de varias maneras diferentes, incluido el uso de colecciones de expresión de inmunoglobulina humana (Stratagene Corp., La Jolla, California) para producir fragmentos de anticuerpos humanos (VH, VL, Fv, Fd, Fab o (Fab')₂ y emplear estos fragmentos para construir anticuerpos humanos completos utilizando técnicas similares a aquellas de producción de anticuerpos quiméricos. Los anticuerpos humanos también se pueden producir en ratones transgénicos con genoma de inmunoglobulina humana. Abgenix, Inc., Fremont, California, y Medarex, Inc., Annandale, Nueva Jersey proporcionan ratones de este tipo. También se pueden crear moléculas de unión a cadenas peptídicas sencillas en las cuales las regiones Fv de la cadena ligera y pesada están conectadas. Los anticuerpos de cadena sencilla ("ScFv") y el método para su construcción se describen en la patente de los EE. UU. N.º 4.946.778. De manera alternativa, se puede construir y expresar de manera similar el Fab (M.J. Evans *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 1995; 184: 123-138). Otra clase de anticuerpos que se pueden emplear en el contexto de la presente invención son los anticuerpos de cadena pesada y sus derivados. Tales anticuerpos de cadena pesada y sencilla se presentan de manera natural en, p. ej., *Camelidae* y sus dominios variables aislados se denominan normalmente como "dominios VHH" o "nanocuerpos". Los métodos para obtener anticuerpos de cadena pesada y los dominios variables se proporcionan *inter alia* en las siguientes referencias: documentos WO 94/04678, WO 95/04079, WO 96/34103, WO 94/25591, WO 99/37681, WO 00/40968, WO 00/43507, WO 00/65057, WO 01/40310, WO 01/44301, EP 1134231, WO 02/48193, WO 97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016, WO 03/055527, WO 03/050531, WO 01/90190, WO 03/025020, WO 04/041867, WO 04/041862, WO04/041865, WO 04/041863 y WO 04/062551. Todos los anticuerpos parcial y completamente humanos son menos inmunogénicos que los MAb completamente murinos (o MAb de otros animales no humanos) y los anticuerpos de cadena sencilla y fragmentos son también menos inmunogénicos. Por tanto, es menos probable que todos estos tipos de anticuerpos susciten una respuesta alérgica o inmunitaria. Por consiguiente, son más apropiados para la administración *in vivo* en humanos que los anticuerpos completamente animales, especialmente cuando es necesaria la administración a largo plazo o repetida. Además, el tamaño menor del fragmento del anticuerpo puede ayudar a mejorar la biodisponibilidad del tejido, la cual puede ser un factor crítico para una mejor acumulación de la dosis en las indicaciones de la enfermedad aguda, tal como tratamiento de tumores o algunas infecciones víricas.

60 Composiciones farmacéuticas

También se describe una preparación farmacéutica que comprende como principio activo un conjugado como el definido en la presente anteriormente. La composición comprende preferentemente al menos un portador farmacéuticamente aceptable (distinto del portador en el conjugado) además del principio activo (el conjugado). En

algunos métodos, el conjugado comprende un polipéptido o anticuerpo de la invención tal como se obtiene al purificarlo de cultivos celulares, microbianos, de insectos o de mamíferos, de leche de mamíferos transgénicos o de otra fuente, que se administra en forma purificada junto con un portador farmacéutico como una composición farmacéutica. Algunos métodos para generar composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos se describen en las patentes de los EE. UU. N.ºs 5.789.543 y 6.207.718. La forma preferida depende del modo de administración previsto y de la aplicación terapéutica. El portador farmacéutico puede ser cualquier sustancia atóxica, compatible, adecuada para suministrar al paciente los vectores de la terapia génica, anticuerpos o polipéptidos. Como portador se pueden emplear sólidos inertes, ceras, grasas, alcohol y agua estéril. También se pueden incorporar en las composiciones farmacéuticas agentes dispersantes, agentes tamponantes, adyuvantes farmacéuticamente aceptables y similares. La concentración del conjugado de la invención en la composición farmacéutica puede variar ampliamente, es decir, desde menos de aproximadamente un 0,1% en peso, normalmente al menos aproximadamente un 1% en peso, hasta un 20% en peso o más. Para la administración oral, se puede administrar el principio activo en formas farmacéuticas sólidas, tales como cápsulas, comprimidos y polvos, o en formas farmacéuticas líquidas, tales como elixires, jarabes y suspensiones. El o los componentes activos se pueden encapsular en cápsulas de gelatina junto con ingredientes inactivos y portadores en polvo, tales como glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, almidón, celulosa o derivados de celulosa, estearato magnésico, ácido esteárico, sacarina sódica, talco, carbonato magnésico y similares. Algunos ejemplos de ingredientes inactivos adicionales que se pueden añadir para conseguir la dispersión, capacidad tamponante, estabilidad, sabor, color deseados u otra característica conocida deseable son los siguientes: óxido de hierro rojo, gel de sílice, laurilsulfato sódico, dióxido de titanio, tinta blanca comestible y similares. Se pueden utilizar diluyentes similares para producir comprimidos. Tanto los comprimidos como las cápsulas se pueden producir como productos de liberación sostenida para proporcionar una liberación continua de la medicación a lo largo de un período de varias horas. Los comprimidos pueden recubrirse con azúcar o recubrirse con una película para enmascarar cualquier sabor desagradable y proteger el comprimido de la atmósfera, o recubrirse con un recubrimiento entérico para una desintegración selectiva en el tracto gastrointestinal. Las formas farmacéuticas líquidas para la administración oral pueden contener colorantes y saborizantes para aumentar la aceptación por parte de los pacientes. Los conjugados de la invención se administran preferentemente por vía parental. La preparación de los conjugados para la administración parental debe ser estéril. La esterilización se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estéril, antes o después de la liofilización y reconstitución. La ruta parental para la administración de los conjugados concuerda con los métodos conocidos, p. ej., inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intralesional, intracraneal, intratecal, transdérmica, nasal, bucal, rectal o vaginal. El conjugado se administra de manera continua por infusión o inyección en bolo. Se podría preparar una composición típica para la infusión intravenosa que contuviera de 10 a 50 mL de glucosa al 5% o NaCl al 0,9% estéril opcionalmente suplementado con una solución de albúmina al 20% y la dosis requerida del conjugado. Se prepararía una composición farmacéutica típica para la inyección intramuscular de manera que contuviera, por ejemplo, 1-10 mL de agua tamponada estéril y la dosis requerida del conjugado de la invención. Los métodos para preparar composiciones administrables por vía parenteral son muy conocidos en la técnica y se describen más detalladamente en varias fuentes, incluido, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (15.^a ed., Mack Publishing, Easton, PA, 1980).

Para las aplicaciones terapéuticas, se administran las composiciones farmacéuticas a un paciente afectado de una infección vírica o una afección asociada en una cantidad suficiente para reducir la gravedad de los síntomas y/o prevenir o detener un mayor desarrollo de los síntomas. Una cantidad adecuada para conseguir esto es la definida como "dosis eficaz profilácticamente" o "terapéuticamente". Tales dosificaciones eficaces dependerán de la gravedad de la afección y del estado general de salud del paciente.

En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se emplean en un sentido no limitante para dar a entender que los artículos que siguen a la palabra están incluidos, pero que los artículos no mencionados específicamente no están excluidos. Además, la referencia a un elemento por medio del artículo indefinido "un", "uno" o "una" no excluye la posibilidad de que más de uno de los elementos esté presente, a menos que el contexto requiera claramente únicamente la presencia de uno de los elementos. Por tanto, el artículo indefinido "un", "uno" o "una" normalmente significa "al menos uno/a".

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una fotografía representativa de la incorporación específica del receptor y la localización (peri)endosomal celular de CRM 197-FITC en células LLC-PK1.

La Figura 2 muestra una fotografía representativa de la incorporación específica del receptor y la localización (peri)endosomal celular de CRM 197-PEG-liposomas a los que se ha añadido RBV (marcados con Rho-PE) en células LLC-PK1.

La Figura 3 muestra una fotografía representativa de la incorporación de glutatión-PEG-liposomas (marcados con Rho-PE) en BCEC.

La Figura 4 muestra fotografías representativas del direccionamiento a través de un receptor específico de CRM 197-FITC a los órganos y tejidos de hámster indicados, y la comparación con HRP-FITC, 90 minutos después de una inyección en bolo intravenosa única.

5 La Figura 5 muestra fotografías representativas del direccionamiento a través de un receptor específico de CRM 197-PEG-liposomas a los órganos y tejidos de hámster indicados, y la comparación con los PEG-liposomas de control, 24 horas después de la última de las inyecciones en bolo intravenosas diarias aplicadas durante 8 días consecutivos.

10 La Figura 6 muestra fotografías representativas del direccionamiento a través de un receptor específico de glutatión-PEG-liposomas a los órganos y tejidos de hámster indicados, y la comparación con los PEG-liposomas de control, 24 después de la última de las inyecciones en bolo intravenosas diarias aplicadas durante 9 días consecutivos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Conjugación de agentes antivíricos con ligandos específicos de un receptor

15 Se describe el método preferido de conjugación de ribavirina con CRM 197 como un ejemplo de conjugación antivírica a ligandos específicos de un receptor.

La conjugación de ribavirina con CRM 197 modificada de Brookes *et al.* (2006, *Bioconjugate Chem.*, 17:530-537), se preparó haciendo reaccionar RBV con oxiclورو de fósforo (POCl₃) y fosfato de trimetilo (TMP), monitorizando el progreso de la reacción por HPLC en fase inversa C18. RBV (2 mmol) se hizo reaccionar con POCl₃ (8 mmol) y agua purificada (2 mmol) en 8,3 mL de TMP. Tras el término de la reacción (5h), se vertió el producto sobre 20 g de hielo y se añadió una solución de hidróxido sódico 2N para ajustar el pH a 3. Se dejó que se hidrolizara el producto durante toda la noche a temperatura ambiente. El producto hidrolizado se extrajo con 2 x 20 mL porciones de cloroformo. Se mezcló el producto RBV-P en cloroformo con 10 g de carbón fino (100-400 mesh). La pasta constituida por la mezcla de reacción/carbón se centrifugó a 2000g durante 15 min, y se recuperó el sobrenadante. Se repitieron los pasos de lavado hasta que no se pudo detectar, por HPLC en fase inversa C18 o por el método Ames, fosfato inorgánico (Pi) en el sobrenadante. El carbón se extrajo tres veces con etanol/agua/hidróxido amónico (10:10:1) y los extractos combinados se evaporaron a sequedad. La sal amónica de RBV-P resultante se transformó en el ácido libre por medio de intercambio iónico utilizando la resina BioRAD AG 50W-X2 (forma H) y elución del producto con agua de acuerdo con el método de Streeter. El rendimiento aislado tras la purificación fue del 70%. El RBV-P se caracterizó empleando dos ensayos: la cuantificación por HPLC en fase inversa C18 del RBV liberado por escisión enzimática utilizando una fosfatasa ácida (ensayo de la fosfatasa ácida) y cuantificación del fosfato inorgánico (Pi) total por el método Ames. El RBV-P se convirtió en ribavirin-5'-monofosforimidazolida (RBV-P-Im) de acuerdo con el procedimiento de Fiume con ligeras modificaciones. La reacción se llevó a cabo en nitrógeno seco utilizando disolventes anhidros. RBV-P (324 mg, 1 mmol) se disolvió en 10 mL de *N,N*-dimetilformamida (DMF). Se disolvió carbonildiimidazol (CDI, 5 mmol) en 5 mL de DMF y se añadió a la solución de RBV-P con agitación, seguido de la adición de una disolución previa recién preparada de 5 mmol de imidazol en 5 mL de DMF. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 45 min seguido de la eliminación de la DMF por evaporación. El sólido céreo resultante se disolvió en 2 mL de etanol, seguido de la precipitación del producto RBV-P-Im mediante la adición lenta de 20 mL de éter. El precipitado se lavó dos veces con éter y el éter residual se evaporó utilizando una corriente suave de nitrógeno seco. Se aisló RBV-P-Im con un rendimiento del 90% y se utilizó inmediatamente para la conjugación con CRM 197. CRM 197 (667 nmol, 40 mg) (10 mL de una solución de 4 mg/mL en agua purificada) se mezcló con 10 µmol (3,74 mg) de RBV-P-Im disuelto en 860 µL de bicarbonato sódico 0,1 M, pH 9,5, tampón (proporción 150:1 de RBV-P-Im respecto a CRM 197). El pH de la mezcla de reacción se mantuvo a un pH de 9,5-9,6 durante la primera hora mediante adición, según fue necesario, de una solución de carbonato sódico 0,2 M. El grado de modificación de CRM 197 se monitorizó por HPLC de intercambio aniónico. La mezcla de reacción final se purificó por diálisis (peso molecular límite de 10 kDa) frente a PBS (3 x 0,5 L de cambios), se esterilizó por filtración (filtro de 0,2 µm) y se almacenó a 4 °C.

Se aplicó una química de conjugación similar a los agentes antivíricos similares y a los otros análogos de nucleósidos descritos en la presente y a los otros ligandos específicos del receptor descritos en la presente para el direccionamiento intracelular.

Con el fin de determinar visualmente la incorporación celular específica del receptor, así como las propiedades farmacocinéticas *in vivo* y la biodistribución de CRM 197 conjugado con un agente antivírico hidrofílico (como la mayoría de los análogos de nucleósidos, incluida la ribavirina y similares), se marcó CRM 197 con el tinte fluorescente hidrofílico isotiocianato de fluoresceína (FITC). Para esto, se disolvió CRM 197 (100 nmol, 6 mg) en 1,2 mL de PBS y 120 µL de NaHCO₃ 1M, pH 9,0, se añadió FITC (2 µmol, 78 µL de una disolución patrón de 10 mg/mL en DMSO preparada recientemente) y se agitó la solución en la oscuridad durante 1 h a temperatura ambiente. El exceso de FITC se eliminó por ultracentrifugación (Zebra™, Pierce, Rockford, EE. UU.) tras lo cual la solución se almacenó en la oscuridad a 4 °C. El número de moléculas de FITC por molécula de CRM 197 (de 3 a 6) se

determinó midiendo la solución a 494 nm. El mismo procedimiento de marcación se aplicó a la peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés) como una proteína de control.

Ejemplo 2

Conjugación de ligandos específicos del receptor con nanorrecipientes que contienen agentes antiviricos

5 Se describe el método preferido de conjugación de CRM 197 con liposomas PEGilados a los que se ha añadido RBV como un ejemplo de un agente antivirico que contiene nanorrecipientes recubiertos con ligandos específicos del receptor.

Los liposomas consistieron en 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (DPPC) y colesterol (Cho) en una relación molar de 2,0:1,5. Se disolvieron los componentes en CHCl₃/MeOH (1:1, v/v). Se preparó una película lipídica de DPPC (50 μmol) y Chol (37,5 μmol) por evaporación de los disolventes a presión reducida. Cuando fue necesario, se añadió fosfato dicetilico (DP) (relación molar de 0,22) a la mezcla. Se hidrataron los lípidos en 1 mL, de 100-120 mg/mL, de RBV (o hasta >500 mg/mL calentando la solución a 50 °C), en PBS que contenía un 3,5% mol de DSPE-PEG-MAL (PM 3400) y un 3,5% mol de DSPE-mPEG (PM2000). Tras agitar en un vórtex, se extrudieron las vesículas a través de dos membranas de policarbonato con un diámetro de poro de 200 nm (9x), de 100 nm (9x) y finalmente de 50 nm (9x) a una temperatura de 42 °C. Se utilizaron directamente los liposomas para la conjugación con CRM 197. En la presente, se modificó CRM 197 con el reactivo de Traut (2-iminotiolano-HCl = 2-IT, 15 equivalentes) durante 1 h a temperatura ambiente en tampón de borato 160 mM pH 8,0 que contenía EDTA 1 mM. Se eliminó el exceso de 2-IT por ultracentrifugación (columna Zebra™, Pierce, Rockford, EE. UU.). Por cada μmol de fosfolípidos se añadieron 50-100 μg de CRM 197 modificado para que, al agitar a 4 °C toda la noche, se produjera la conjugación. De manera alternativa, se sintetizó DSPE-PEG-CRM 197 antes de la preparación de los liposomas utilizando DSPE-PEG-MAL y CRM 197 modificado con 2-IT. Se añadió DSPE-PEG-CRM 197 ya sea a la mezcla de lípidos hidratada antes de la extrusión o tras la extrusión mediante incubación de 25 °C a 55 °C durante de 2 a 24 horas (dependiendo de la sensibilidad a la temperatura de la carga), con el fin de obtener el grado de incorporación óptimo al liposoma del resto de direccionamiento. El CRM 197 sin unir y el RBV libre se eliminaron utilizando una columna Sephrose CL 4B o por ultracentrifugación. Se caracterizaron los liposomas midiendo el tamaño de partícula (100-119 nm p.i. 0,07-0,19 en un Zetasizer Malvern 300 HAS), el potencial zeta (-18/-9 mV ± 6,5 en un Zetasizer Malvern 300 HAS), el contenido en fosfolípidos (14-21 mM, utilizando el kit Phospholipids B de Wako Chemicals GmbH) y el contenido proteico (0,2-0,6% mol de CRM 197 según un kit Modified Lowry de Pierce) y la carga del fármaco (RBV) (5-21%, determinado a 206-210 nm en una solución de alcohol *iso*-propílico en un espectrómetro UV/VIS Agilent 8453).

De manera alternativa, se reemplazó DSPE-PEG-CRM 197 por DSPE-PEG-glutación, el cual se sintetizó antes de la preparación de los liposomas utilizando DSPE-PEG-MAL y soluciones frescas de glutación reducido (que proporcionaron un grupo tiol reactivo con MAL en el resto cisteína del tripéptido).

Se aplicó un atrapamiento liposomal similar a los otros agentes antiviricos similares y a los otros análogos de nucleósidos descritos en la presente, y una química de conjugación similar a los otros ligandos específicos del receptor para el direccionamiento intracelular descritos en la presente. Además, se aplicó un atrapamiento liposomal similar a los fármacos antiviricos basados en ácidos nucleicos, con un enriquecimiento adicional del atrapamiento del ácido nucleico por adición de un derivado catiónico del colesterol (DC-Chol) a los liposomas, tal como se describe en Gao y Huang, 1991, *Biochem Biophys Res Commun.* 179(1):280-5, o utilizando liposomas anfóteros, como se describe en el documento WO2002/066012.

Con el fin de determinar visualmente la incorporación celular específica del receptor, así como las propiedades farmacocinéticas *in vivo* y la biodistribución de CRM 197 o del glutación conjugado con el liposoma lleno con el agente antivirico (como análogos de nucleósidos, incluida la RBV y similares), se añadió 1,2-dioleil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-*N*-lisamina Rodamina B sulfonilo (Rho-PE 0,1% mol) a la mezcla de lípidos durante la preparación de los liposomas. De manera alternativa se marcaron los liposomas con una molécula trazadora radiactiva.

Ejemplo 3

Conjugación de ligandos específicos del receptor con un portador para generar fármacos antiviricos basados en ácidos nucleicos

50 Se describe el método preferido de conjugación de CRM 197 PEGilado con la polietilenimina (PEI) como un ejemplo de un sistema de suministro no vírico para fármacos antiviricos basados en un ácido nucleico por medio de un mecanismo de incorporación mediada por el receptor.

Se prepararon complejos PEGilados tal como sigue. Se disolvió PEI (25 kDa, ramificado, 3,3 mg, 133 nmol) en PBS con una concentración de 5 mg/mL. Se añadió poli(etilenglicol)- α -maleimida- ω -NHS (NHS-PEG-VS, PM 5000, 266 nmol, 1,4 mg) a esta solución y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente mientras se mezclaba. Se eliminó el exceso de NHS-PEG-VS por ultracentrifugación (columna Zebra™, Pierce, Rockford, EE. UU.). Se utilizó directamente PEI-PEG-VS para la conjugación con CRM 197. En la presente, se modificó CRM 197 (133 nmol, 8 mg en 1,6 mL de tampón de borato 160 mM, pH 8,0, que contenía EDTA 1 mM) con 2-IT (2,66 μmol, 183 μL, solución

14,5 mM en tampón de borato 160 mM, pH 8,0) durante 1 h a temperatura ambiente. Se eliminó el exceso de 2-IT por ultracentrifugación (columna Zebra™, Pierce, Rockford, EE. UU.). Se conjugó CRM 197 con tiol activado toda la noche a 4 °C con PEI-PEG-VS utilizando una proporción molar 1:1. Se añadió PBS (4 mL) y se concentró la solución utilizando una columna Vivaspín (Sartorius, Epsom, GB) para eliminar el CRM 197 o PEI-PEG-VS que no habían reaccionado. Se determinó la pureza del conjugado por SDS PAGE. Cuando fue necesario (y después de la complejación con los fármacos antiviricos basados en un ácido nucleico), se purificaron adicionalmente los constructos en una columna Sephrose CL 4B. Se aplicó el mismo procedimiento de conjugación a la HRP como proteína de control.

Ejemplo 4

10 Incorporación celular específica del receptor y/o transporte transcelular de agentes antiviricos dirigidos

Se determinó visualmente la incorporación celular específica del receptor del conjugado CRM 197-RBV mediante el análisis de la incorporación específica del conjugado CRM 197-FITC, y se comparó con el nivel de incorporación de HRP-FITC y de la fluoresceína sódica libre. Se emplearon células de varias especies y orígenes con una expresión conocida de DTR, incluidas las células epiteliales renales porcinas (LLC-PK1), células endoteliales capilares cerebrales bovinas (BCEC, por sus siglas en inglés), células de fibroblastos de riñón de mono (COS-1) y células de glioblastoma humano. En particular, se incubaron las células LLC-PK1 durante 1 h en placas de 24 pocillos en 400 microlitros de DMEM+FCS suplementado con 100 microgramos/mL de heparina, antes de añadir al pocillo 5 microgramos de CRM 197-FITC o HRP-FITC. Dos horas más tarde, se lavaron las células 3 veces y se lisaron las células con 100 microlitros de NaOH 0,1 N y se determinó la fluorescencia a 480/530 nm en un lector de placas fluostar. Se determinó la proteína celular por pocillo con un ensayo Biorad DC y se calculó la fluorescencia en el lisado celular por mg de proteína celular. En un grupo separado de células, se añadió un exceso de 100 microgramos de CRM 197 libre al pocillo, 30 minutos antes de añadir el conjugado CRM 197-FITC al medio. Las células LLC-PK1 contenían 0,54 +/- 0,02 microgramos de CRM 197-FITC por mg de proteína celular, la cual se redujo significativamente a 0,35 +/- 0,04 microgramos de CRM 197-FITC por mg de proteína celular después de preincubar las células con CRM 197 libre. No se detectó HRP-FITC en los lisados celulares. Estos experimentos muestran que CRM 197-FITC es incorporado de manera específica por el DTR expresado en las células LLC-PK1. En un conjunto separado de experimentos, se cultivaron las células LLC-PK1 en condiciones similares en cubreobjetos y se expusieron a CRM 197-FITC, HRP-FITC o fluoresceína sódica. Tras la fijación y el montaje con vectashield con DAPI para la tinción nuclear, se analizaron los cubreobjetos en un microscopio de fluorescencia y se fotografiaron. La Figura 1 muestra una fotografía representativa de la incorporación específica del receptor y la localización (peri)endosomal celular de CRM 197-FITC en estas células. No se detectó ninguna señal fluorescente en las células incubadas con HRP-FITC y fluoresceína sódica. Se obtuvieron resultados idénticos en las células de glioblastoma humano, COS-1 y BCEC, también tras varios periodos de tiempo (hasta 24 horas tras la exposición). De manera interesante, cuando el medio de incubación que contenía el CRM 197-FITC se eliminó tras 2 horas y se reemplazó por DMEM+FCS, la marca fluorescente se distribuyó homogéneamente a lo largo del citosol 4 horas más tarde, lo que indicaba que el conjugado se había liberado del endosoma.

Además, en un conjunto similar de experimentos en el modelo de la BHE descrito por Gaillard *et al.* (2001, *Eur J Pharm Sci.* 12(3): 215-222), BCEC expuestos durante hasta un máximo de 2 horas a CRM 197-PEG-liposomas (marcados con Rho-PE, tamaño entre 50 y 200 nm, que contenían entre 5 y 1000 proteínas CRM 197) cargados con RBV (entre un 5 y un 25% de la concentración aplicada; aproximadamente 18 mg/mL de la solución de liposomas) fueron incorporados de manera específica por las BCEC, cuando no se pudieron detectar en las células PEG-liposomas cargados con RBV. En este modelo de la BHE, no se observó ningún efecto sobre la integridad de la BHE (como determinó la resistencia eléctrica transendotelial) por parte de los liposomas cargados con RBV (que contenían el equivalente a 1,8 mg/mL de RBV), o por parte de la RBV libre (hasta 1 mg/mL). En un ensayo MTT sobre células LLC-PK1, sin embargo, se descubrió que 10 mg/mL de RBV resultaban tóxicos tras 5 h (60% de viabilidad celular). La Figura 2 muestra una fotografía representativa de la incorporación específica del receptor ("punteada") de CRM 197-PEG-liposomas cargados con RBV en células LLC-PK1 tras 4 horas de incubación en DMEM+FCS. No se detectó ninguna señal fluorescente específica del receptor en las células incubadas con HRP-PEG-liposomas. Además, se obtuvieron resultados similares de incorporación específica con glutatión-PEG-liposomas en BCEC, mientras que no se observó incorporación en las células LLC-PK1, lo que indica que la incorporación estuvo mediada de manera específica por los receptores expresados en las BCEC. La Figura 3 muestra una fotografía representativa de la incorporación de glutatión-PEG-liposomas cargados con RBV en BCEC tras 4 y 24 horas de incubación en DMEM+FCS.

Ejemplo 5

55 Propiedades farmacocinéticas y biodistribución de agentes antiviricos dirigidos

Se determinaron visualmente las propiedades farmacocinéticas y la biodistribución del conjugado CRM 197-RBV por análisis del conjugado CRM 197-FITC tras una inyección en bolo intravenosa en hámsters, y se comparó con el conjugado HRP-FITC. Sesenta minutos después de la dosis por inyección intravenosa de 1 mg por hámster de proteína marcada con FITC (n=4), se determinó que la vida media plasmática de CRM 197-FITC era significativamente más alta (12 horas para CRM 197-FITC, en comparación con 38 minutos para HRP-FITC), cuando

en ese momento la AUC era esencialmente la misma (+/- 7000 microgramos*min/mL). En comparación, se descubrió que la vida media y la AUC de 1 mg de fluoresceína sódica en ratas por inyección en bolo intravenosa era de 35 minutos y 13 microgramos*min/mL, respectivamente. Estas propiedades farmacocinéticas del conjugado CRM 197 ofrecen características de suministro favorables de los agentes antivíricos. Además, los conjugados 5 direccionados mostraron una acumulación específica en una selección de tejidos analizados (incluido el cerebro, corazón, pulmón, hígado, bazo (es decir, linfocitos) y riñón, pero no mucho en el tejido muscular) cuando se compararon con los conjugados (HRP) de control los cuales no fueron detectables (o apenas lo fueron) en estos tejidos 90 minutos después de la inyección (en la Figura 4 se muestran fotografías representativas).

Además, se determinaron visualmente en dos conjuntos similares de experimentos la biodistribución de CRM 197-PEG-liposomas (marcados con Rho-PE) y glutatión cargados con ribavirina por medio de un análisis de la Rho-PE, el componente que sirve de marca, tras 8 o 9 inyecciones en bolo intravenosas repetidas en hámsters, y comparadas con un control de PEG-liposomas (no direccionados). En cuanto a los conjugados CRM 197-FITC, los liposomas direccionados con CRM 197 mostraron una acumulación específica en una selección de tejidos 10 analizados (incluido el cerebro, corazón, pulmón, hígado, bazo (es decir, linfocitos) músculo y riñón) en comparación con los liposomas de control los cuales no fueron detectables (o apenas lo fueron) en el cerebro y lo fueron en un grado mucho menor en estos tejidos 24 horas después de la última inyección. La Figura 5 muestra fotografías 15 representativas de estos tejidos.

Los liposomas direccionados con glutatión mostraron una acumulación específica y mayor en el cerebro perfusionado de hámster y menos en una selección de tejidos diferentes analizados (incluido el corazón, pulmón, 20 hígado, bazo y riñón) en comparación con los liposomas de control los cuales no fueron detectables (o apenas lo fueron) en el cerebro, pero lo fueron en un grado relativamente mayor en los tejidos de pulmón, riñón e hígado, 24 horas después de la última inyección. La Figura 6 muestra una fotografía representativa de una selección de estos tejidos.

Dado que se sabe que la propia PEI es tóxica en células y animales, se evaluó el perfil de toxicidad de componentes poliplex con un plásmido LacZ y CRM 197-PEG-PEI durante dos días tras la inyección en bolo intravenosa en hámsters, y se comparó con los componentes poliplex (HRP-PEG-PEI y plásmido LacZ) de control. Los hámsters no mostraron señales de sufrimiento o enfermedad por las inyecciones (50 microgramos de ADN, con una proporción 25 N/P de 1,2), por tanto los animales toleraron bien los componentes poliplex.

Ejemplo 6

Actividad antivírica de los agentes antivíricos dirigidos *in vitro*

Para ejemplificar la potencia de la invención descrita, se evaluó la actividad antivírica específica del receptor en células Vero (básicamente de acuerdo con Leyssen *et al.*, 2005, *J Virol.*, 79:1943-1947). Se determinaron los efectos dosis-respuesta de RBV, el conjugado CRM 197-RBV, CRM 197-PEG-liposoma cargado con RBV y CRM 35 197-PEG-PEI con componentes poliplex de ácidos nucleicos específicos de un virus sobre la replicación de una muestra de agentes víricos relevantes (incluido JEV y WNV (con secuencias ARNip FvE J, 5'- GGA TGT GGA CTT TTC GGG A -3' (JEV nt 1287-1305); FvE JW, 5'- GGG AGC ATT GAC ACA TGT GCA -3' (JEV nt 1307-1328); y FvE W, 5'- GGC TGC GGA CTG TTT GGA A -3' (WNV nt 1287-1305), como se describe en Kumar *et al.*, 2006, *PLoS Med.*, 3(4):e96); y 3Dz, ADNzima anti-JEV con secuencia 5'-CCT CTA AGG CTA GCT ACA ACG ACT CTA GT -3' (JEV nt 10749-10763 y 10827-10841), como se describe en el documento WO2006064519) y RSV (con una 40 secuencia de tronco con forma de horquilla de ARNip contra la diana NLS1 5'- GGC AGC AAT TCA TTG AGT ATG CTT CTC GAA ATA AGC ATA CTC AAT GAA TTG CTG CCT TTT TG -3' como se describe en Kong *et al.*, 2007, *Genet Vaccines Ther*, 5:4). Se infectaron monocapas de células Vero confluentes de un día, cultivadas en placas de microvaloración de 96 pocillos, con los virus respectivos con una multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) de 0,1 en presencia o ausencia de diluciones en serie de los agentes antivíricos respectivos. Se incubaron 45 los cultivos a 37 °C durante 5 días, cuando se infectaron, los cultivos no tratados mostraron un efecto citopático (CPE, por sus siglas en inglés) obvio. Para cada afección, se combinó el sobrenadante de 2-4 pocillos y, a continuación, se extrajo el ARN total (mini kit QIAamp viral RNA). Se cuantificó el ARN vírico utilizando una PCR cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR, por sus siglas en inglés) de un único paso. Cada uno de los compuestos provoca una inhibición dependiente de la concentración de la síntesis de los agentes víricos ensayados. 50 Los compuestos RBV dirigidos demostraron ser los más potentes y RBV es el compuesto menos potente (por ejemplo, para la YFV, la CE50 para la inhibición de la síntesis de ARN [ARN CE50] de la ribavirina es de 12,3 ± 5,6 µg/mL).

Ejemplo 7

Actividad antivírica de los agentes antivíricos dirigidos *in vivo*

Se determinó la actividad antivírica específica del receptor en un modelo en hámster para las infecciones por flavivirus en humanos, representadas por la encefalitis aguda, un síndrome similar a la poliomielitis y las secuelas 55 neurológicas (Leyssen *et al.*, 2003, *Brain Pathol.*, 13:279-290), utilizando MODV. En este modelo se ha observado que el conjugado CRM 197-RBV y el CRM 197-PEG-liposomas con RBV, reducen significativamente la morbilidad y

las secuelas neurológicas. Aunque los glucocorticoides y los interferones no son eficaces clínicamente para tratar la encefalitis japonesa (Hoke *et al.*, 1992, *J. Infect Dis.*, 165:631-637, y Solomon *et al.*, 2003, *Lancet*, 361:821-826), se ha observado que la medicación conjunta de dexametasona e interferón alfa-2a, tanto juntos como por separado, en combinación con el tratamiento con el conjugado CRM 197-RBV y el CRM-PEG-liposomas con RBV, reduce en mayor grado la morbilidad y las secuelas neurológicas.

5

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que se puede obtener haciendo reaccionar diestearioilfosfatidiletanolamina-polietilenglicol-maleimida (DSPE-PEG-MAL) con glutatión reducido.
- 5 2. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, donde el DSPE-PEG-MAL tiene un peso molecular de aproximadamente 3400 Daltons.
3. Un liposoma que comprende un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
4. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 3 que contiene un fármaco.
5. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 4, donde el fármaco es un fármaco antivírico.
6. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 5, donde el fármaco antivírico es la ribavirina.
- 10 7. Un método para sintetizar un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el método comprende el paso de hacer reaccionar DSPE-PEG-MAL con glutatión reducido.
8. Un método para preparar un liposoma que comprende un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el método comprende el paso de acoplar un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 a un liposoma.
- 15 9. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, para el suministro de fármacos a través de una barrera hematotisular.
10. El uso de un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, para la producción de un medicamento para transportar fármacos a través de una barrera hematotisular.
- 20 11. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 9 o un uso de acuerdo con la reivindicación 10 para transportar fármacos a través de la barrera hematoencefálica.

Fig 1

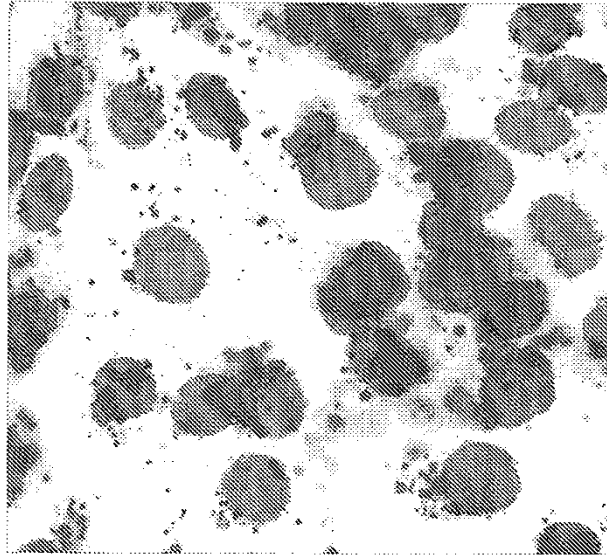


Fig 2

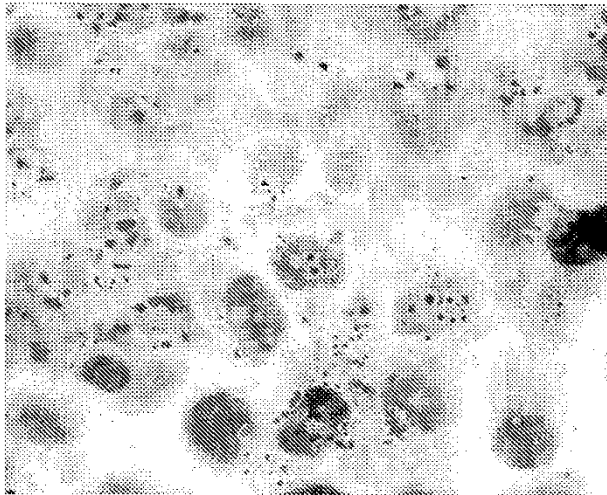


Fig 3

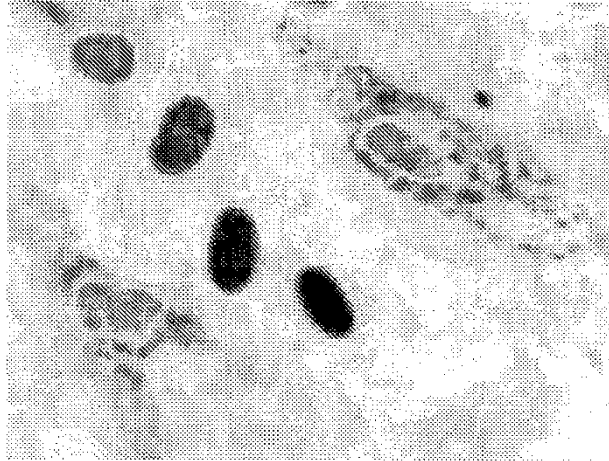


Fig 4

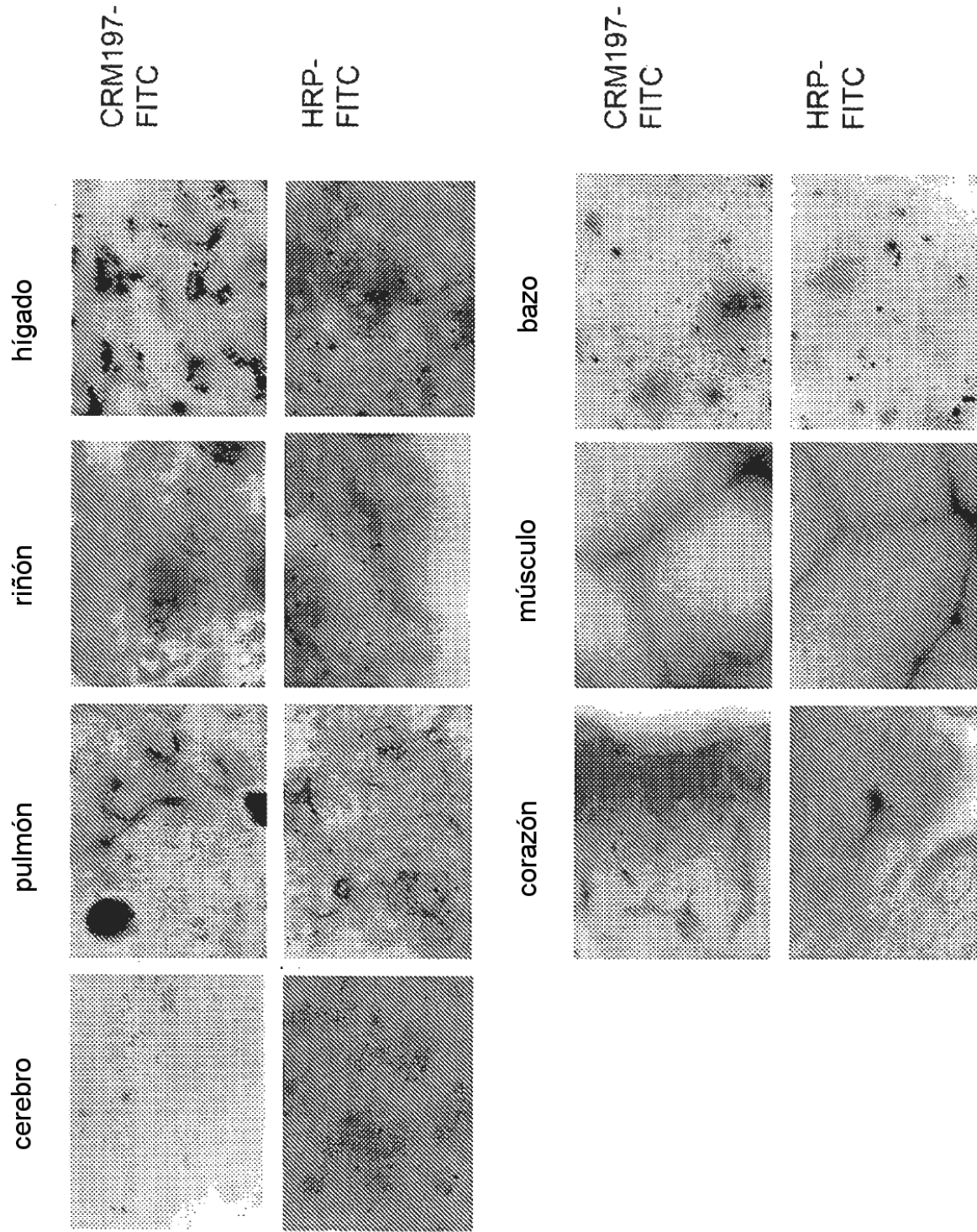


Fig 5

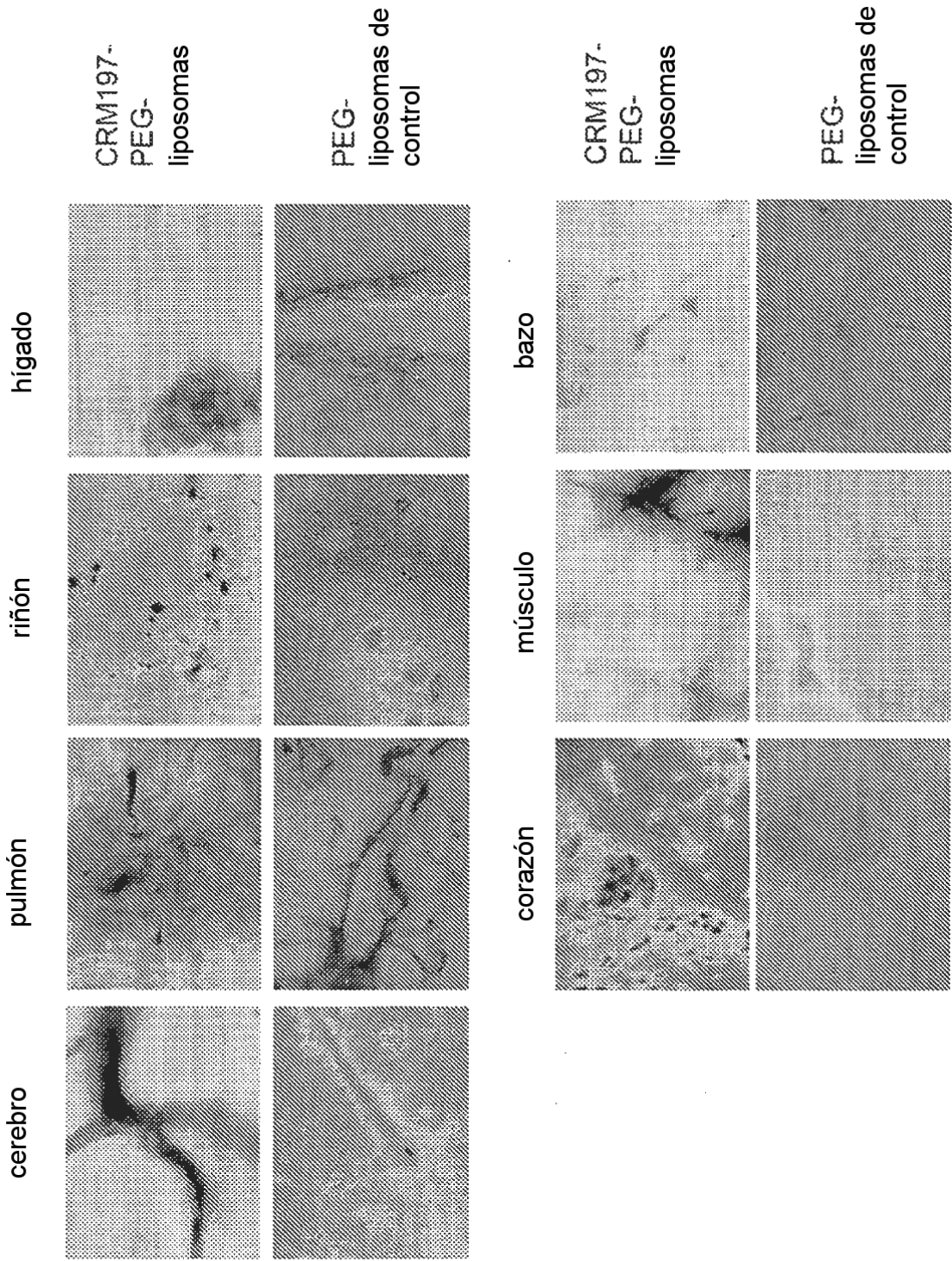


Fig 6

