

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 412**

51 Int. Cl.:

A61K 47/54 (2007.01)

A61K 47/55 (2007.01)

A61K 31/4706 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2011 E 16183451 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 3135301**

54 Título: **Sistema de suministro in vivo optimizado con agentes endosomolíticos para conjugados de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

22.06.2010 EP 10166936

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

29.06.2018

73 Titular/es:

**ONXEO (33.3%)
49, boulevard du Général Martial Valin
75015 Paris, FR;
INSTITUT CURIE (33.3%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**SUN, JIAN-SHENG;
DUTREIX, MARIE y
QUANZ-SCHOEFFEL, MARIA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 674 412 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

Sistema de suministro in vivo optimizado con agentes endosomolíticos para conjugados de ácidos nucleicos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la medicina, en particular de la oncología.

10 Antecedentes de la invención

10 El tratamiento del cáncer consiste principalmente en cirugía siempre que sea posible, agentes citotóxicos tales como quimioterapia y radioterapia. Las terapias moleculares para el tratamiento del cáncer han surgido en la última década, tales como: anticuerpos monoclonales que se dirigen a los receptores de membrana celular, inhibidores del receptor de tirosina cinasa u otras cinasas que dirigen la transducción de señales implicada en la proliferación, muerte y
15 sobrevivencia celular. Como agentes citostáticos, su régimen de monoterapia frecuentemente carece de un beneficio clínico suficiente. Los resultados sinérgicos se obtienen frecuentemente mediante la combinación con agentes citotóxicos pero se limitan por sus efectos secundarios acumulativos.

20 La mayoría de los tratamientos del cáncer provocan directa o indirectamente daños en el ADN en las células tumorales proliferantes tratadas, lo que finalmente conduce a su muerte. Sin embargo, varias resistencias intrínsecas y adquiridas del tumor a estos tratamientos se deben, al menos en parte, a las actividades eficientes de reparación del ADN de las células tumorales. Ahora se reconoce bien que la reparación del ADN es un objetivo importante para la terapia del cáncer (Helleday y otros Nat. Rev. Cancer, 2008, 8:193-204). El desarrollo más avanzado de fármacos en este campo es el de los inhibidores de PARP.

25 Como la reparación del ADN es un proceso esencial de sobrevivencia en todos los seres vivos, estos tienen múltiples vías de reparación especializadas, y tienen algunas redundancias que hacen robusto al proceso cuando una vía es deficiente o está bloqueada por un agente terapéutico, tal como un inhibidor de la reparación del ADN. Por lo tanto, en vez de dirigirse a un gen/proteína clave implicada en el proceso de reparación del ADN sea cual sea su importancia biológica y relevancia clínica, la terapia molecular innovadora debe tratar una o varias vías clave como un objetivo general, junto con las terapias convencionales, para alcanzar el tratamiento del cáncer más eficiente.

35 Esto se concibió para dirigirse generalmente a las vías de detección, señalización y reparación de las lesiones del ADN para desactivar la defensa del cáncer frente a los tratamientos existentes. Una estrategia consiste en introducir moléculas de ADN cortas modificadas que imitan roturas de doble cadena (DSB), llamadas Dbait, en células que hasta entonces podían reparar las DSB de manera eficiente y sobrevivir de esta manera. La eficacia antitumoral de Dbait en asociación con radioterapia (RT) o quimioterapia (CT) se explica por el hecho de que las moléculas de Dbait atrapan los complejos iniciales de detección de DSB, bloquean la señalización de reparación corriente abajo, desorganizan posteriormente todos los sistemas de reparación de DSB (tanto las rutas de Unión de Extremos no Homólogos o de Recombinación Homóloga), y finalmente inhiben la reparación de DSB(WO2005/040378; WO2008/034866; Quanz y otros, 2009, Clinical Cancer Research 15:1308 ; Quanz y otros, 2009, PLoS ONE 4:e6298; Dutreix y otros, 2010, Mut. Res. 704:182). Finalmente, las células cancerígenas no pueden escapar más de su muerte. Además se ha encontrado que las moléculas de Dbait son eficaces solas, sin una combinación con radioterapia (RT) o quimioterapia (CT)(WO2008/084087).

45 Sin embargo, una vez que se identifican los agentes activos de interés clínico, el problema recurrente es encontrar la mejor manera de suministrar los agentes activos, especialmente para los agentes de ácido nucleico. El desarrollo y optimización de sistemas de suministro de ADN/ARN no virales eficientes tiene que abordar los problemas de toxicidad, las «barreras tisulares y sistémicas» tales como la degradación, la opsonización de partículas por componentes séricos cargados, el aclarado rápido y la acumulación en tejidos no objetivos, cuando la sustancia activa se administra por vía sistémica, las "barreras celulares" para su suministro tales como la baja absorción a través de la membrana del citoplasma, la liberación inadecuada de moléculas de ADN en el compartimento celular activo, y la falta de direccionamiento nuclear (requerido para terapia génica).

50 De hecho, para ser eficaces, la mayoría de estos agentes activos deben ser captados por las células y llegar al citoplasma y/o al núcleo. En particular, cuando los agentes activos que incluyen ácidos nucleicos se administran en su forma "libre" o desnuda, frecuentemente sufren de degradación antes y después de la absorción por las células objetivo. Dentro de las células, esta degradación se debe principalmente al hecho de que los ácidos nucleicos entran a las células mediante endocitosis, son secuestradas en los endosomas celulares que finalmente evolucionan en los lisosomas donde la degradación química y enzimática es muy eficiente.

60 En la materia anterior, los agentes activos se han conjugado a varios portadores y se han encapsulado en liposomas, nódulos y nanopartículas donde se protegen de la degradación en suero. La materia anterior también emplea una variedad de sustancias químicas para el acoplamiento covalente de ácidos nucleicos y otros agentes activos a portadores moleculares que incluyen polímeros tales como dextranos o PEG o moléculas que ayudan a disminuir el aclaramiento, portadores que incluyen transferrina, moléculas lipófilas tales como colesterol unido a siARN para

potenciar la absorción celular (Chen y otros, 2010, J. Controlled Release 144:227). Tales portadores pueden incluir porciones de direccionamiento tales como anticuerpos, polipéptidos, ácidos nucleicos y otras sustancias para dirigir los agentes activos a las células objetivo seleccionadas. La materia anterior describe además moléculas que mejoran la endocitosis para el uso en una composición farmacéutica (US2008/0194540).

Sin embargo, cuando los agentes activos de ADN/ARN son absorbidos por las células mediante el proceso de endocitosis, frecuentemente terminan secuestrados en endosomas de donde no pueden escapar, por lo tanto se reduce en gran medida su potencial terapéutico. Por ejemplo, Zimmermann y otros demostraron que un conjugado de colesterol-siARN(ApoB-1) es aproximadamente 1000 veces menos potente que su formulación liposómica (vector SNALP) en ratón: 100 mg/kg de col-siApoB-1 es equivalente a 0,1 mg/kg de SNALP-ApoB-1 (Zimmermann y otros Nature, 2006, 441:111-114, figura complementaria 1).

Para los ácidos nucleicos, la materia anterior ha tratado de resolver este problema mediante el uso de polímeros catiónicos tales como polietiliminina (PEI) (WO96/02655) o liposomas con lípidos o péptidos fusogénicos tales como el vector SNALP. PEI es capaz de desestabilizar los endosomas mediante un efecto de esponja de protones bien descrito y por lo tanto facilita la liberación del ácido nucleico. Sin embargo, el uso de PEI se limita frecuentemente por su toxicidad y hasta ahora no se ha aprobado para el uso en seres humanos. La formulación liposómica también muestra toxicidad y encapsulación limitada de ácidos nucleicos (usualmente en el intervalo de 1-2 mg/mL) que puede no ser adecuado para la aplicación que requiere una alta carga útil de agentes de ácido nucleico.

Se conoce que los agentes "endosomolíticos" tales como las cloroquinas potencian la transfección de ácidos nucleicos facilitando su escape de los endosomas al citoplasma en células cultivadas. Sin embargo, el uso de cloroquina se limita al uso *in vitro* y solo se ha evaluado raramente para ayudar al suministro *in vivo*. Esto puede deberse a informes en la materia de ácidos nucleicos que enseñan en contra de su uso *in vivo* debido a la toxicidad de la Cloroquina.

Benns, y otros (2000, Bioconj. Chem. 11: 637) informaron que "Aunque se ha probado que la cloroquina ayuda en la liberación del ADN plasmídico en el citoplasma, se ha encontrado que es tóxica y que por lo tanto no puede usarse *in vivo*". Este problema se debe en parte al hecho de que se necesitan concentraciones relativamente altas para alcanzar en mismo sitio que el ácido nucleico (es decir ADN plasmídico) en el endosoma. De manera similar, Zhang y otros (2003, J Gene Med 5:209) estudiaron *in vivo* el uso de Cloroquina para el suministro génico al hígado. En este artículo, usaron un plásmido junto con un péptido (polilisina/molossin) como vector de ADN. Concluyeron que, a pesar de que la Cloroquina es eficaz para promover el suministro génico al hígado, se requiere dosificación múltiple y su uso se limita por la toxicidad sistémica. De hecho, demostraron que la toxicidad aguda sistémica de la cloroquina limita el uso *in vivo* a niveles que se encuentran sustancialmente por debajo de los necesarios para el suministro génico óptimo. El suministro local de cloroquina también se limita por la toxicidad local de cloroquina y por su difusión fuera del sitio del suministro. Por último, no observaron un suministro génico o muy bajo nivel cuando se usa el ADN desnudo.

En este contexto, el documento WO2007/040469 describe que la solución al problema de la alta concentración necesaria de cloroquina puede superarse mediante el acoplamiento covalente de la cloroquina al agente activo, lo que reduce de este modo la dosificación general necesaria. El documento WO2009/126933 propone unir covalentemente el ácido nucleico para suministrar tanto a un agente endosomolítico como a un ligando de direccionamiento.

La cloroquina y sus derivados tales como hidroxiclороquina se usan en el tratamiento curativo y profiláctico de la malaria. También se ha estudiado para el uso junto con radioterapia y/o quimioterapia de cánceres (Sotelo y otros, 2006, Ann Intern Med 144:337-342; NCT01023477 y NCT00969306). La hipótesis es que la cloroquina/hidroxiclороquina inhibe la autofagia que es un proceso de defensa celular normal mediante la exportación de agentes terapéuticos a los lisosomas donde se degradan.

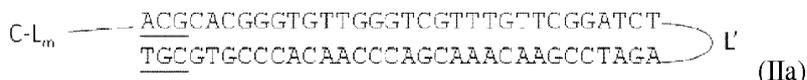
En conclusión, la optimización de terapias basadas en ácido nucleico necesita abordar además la eficiencia y citotoxicidad de los sistemas de suministro de ADN sintético.

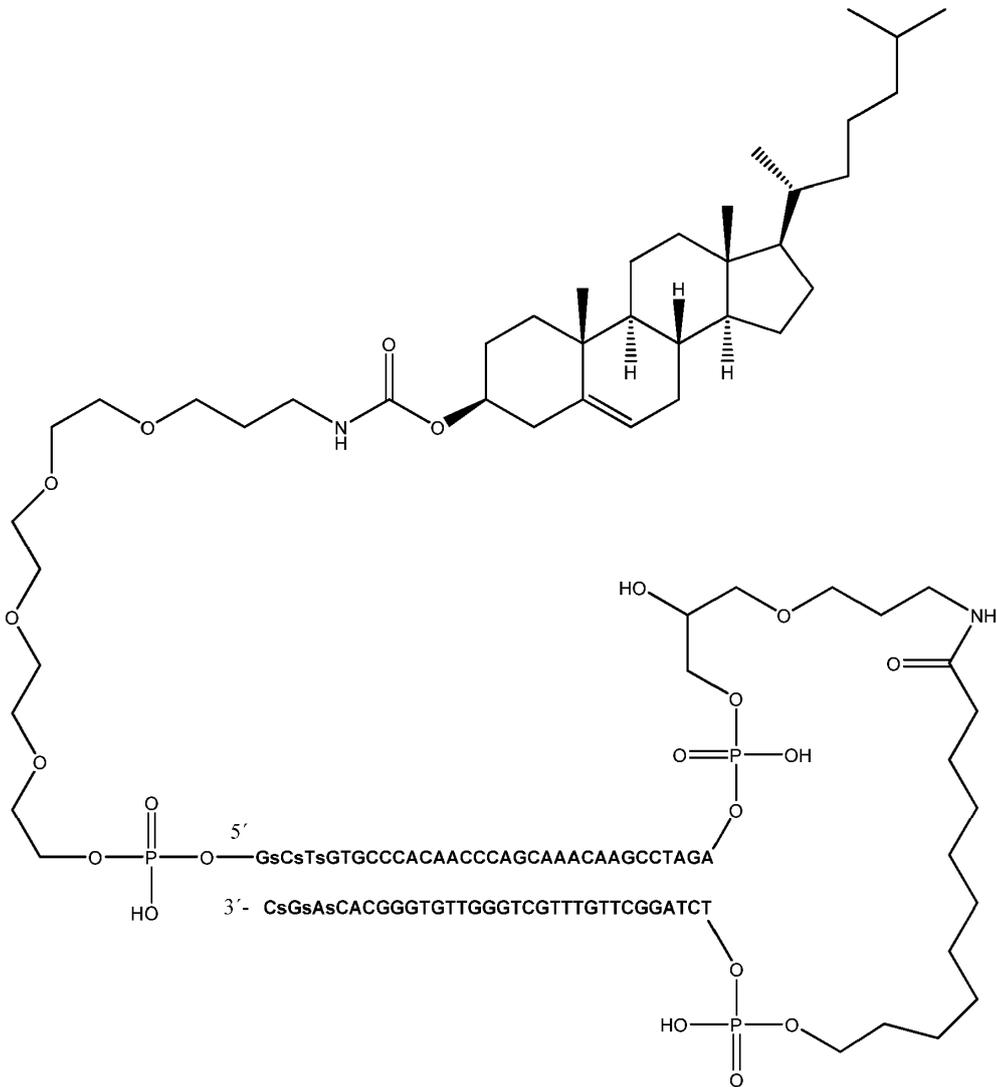
Resumen de la invención

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no se encuentre dentro de las reivindicaciones se proporciona solo como información.

La presente descripción se refiere a un nuevo método eficiente para el suministro *in vivo* de ácidos nucleicos de interés terapéutico en base a la conjugación covalente de ácidos nucleicos de interés terapéutico con una molécula que facilita la endocitosis. En particular, este sistema de suministro *in vivo* se usa para moléculas de Dbait.

Más particularmente, la molécula de ácido nucleico conjugado tiene una de las siguientes fórmulas:





Breve descripción de los dibujos

- 5 Figura 1: Absorción celular de Dbait formulada. (A) Análisis mediante microscopía de complejos de Dbait con PEI11k (a). (B) El análisis por citometría de flujo de la absorción celular se realizó 5 horas después del comienzo del tratamiento para varias condiciones de transfección. Dbait-cy3 con superfect, 2 µg/ml de coDbait-cy3 sin y con el tratamiento de cloroquina antes de la transfección, 25 µg/ml de coDbait-cy3 sin y con CQ.
- 10 Figura 2: Actividad de Dbait formulada. (A) La activación de ADN-PK se midió después de la adición de 50 u de complejo enzimático purificado a ningún ADN, 0,25 µg de Dbait o 0,25 µg de coDbait, (B) Inmuno detección de γ-H2AX en células 24 horas después del tratamiento con 1,6 µg/ml de Dbait (izquierda), 1,6 µg/ml de Dbait/PEI11K (medio), 16 µg/ml de coDbait con CQ. barra de escala: 20 µm. (C) Cuantificación de γ-H2AX, 5 horas (negro) y 24 horas (gris) después del tratamiento con varias Dbait formuladas. Todas las transfecciones se realizaron con 1,6 µg/mL de Dbait o 16 µg/mL de coDbait. Cuando se indica, CQ se añadió antes de la transfección.
- 15
- 20 Figura 3: Fenotipos 24 horas después de la inyección de Dbait en el espacio extracelular de embriones de pez cebra en etapa celular 1K. (A-C) Vistas laterales anteriores a la izquierda de los embriones de pez cebra 24 horas después de la inyección de Dbait-cy3 + PEI (2-5 nL) en el polo animal de los embriones de pez cebra en etapa celular 1K: panel superior, vista de campo brillante; panel inferior, aumento 2x de la región de cabeza con superposición de epifluorescencia que se muestra en Dbait-cy3 rojo. (A) Fenotipo tipo 1 indistinguible del no inyectado (no se muestra). (B) Fenotipo leve tipo 2 con muerte celular extensa en la región de cabeza. (C) Teratogénesis fuerte tipo 3 y muerte celular generalizada. (D) Histograma que muestra el porcentaje de las tres clases fenotípicas en dependencia del adyuvante. Se analizaron más de 100 embriones para cada condición. NA: Dbait inyectada sola; Sup: Superfect; PEI 25k, 22k, 11k del tamaño correspondiente; cloro: cloroquina; Lut: Lutrol.
- 25

Figura 4: Difusión y actividad en tumores. Los tumores se inyectaron con 1,6 µg de Dbait-cy5.5/PEI o 16 µg de coDbait-cy5.5 (1/10 de cDDbait etiquetado con c5.5 + 9/10 de coDbait no etiquetado para mantener una intensidad de fluorescencia similar) y se analizaron al día siguiente para la distribución de fluorescencia y la actividad de ADN-PKcs. Difusión de Dbait fluorescente después de dos tipos de inyecciones: una inyección intratumoral o dos inyecciones subcutáneas.

Figura 5: Supervivencia de 5 grupos de ratones desnudos que portan xenoinjerto de melanoma SK28: 1) sin tratamiento (n = 16); 2) irradiados (IR, n=12); 3) irradiados con 1 mg de cloroquina inyectada por vía intraperitoneal (CQ, IR, n = 10); 4) tratados con 0,6 mg de DT01 inyectados intratumoralmente (también denominado CoDbait) e irradiados 5 horas más tarde (DT01, IR, n=11) y 5) pretratados con 1 mg de cloroquina inyectada por vía intraperitoneal 2 horas antes inyección intratumoral de 0,6 mg de DT01 (también denominado CoDbait) e irradiados 5 horas después (DT01, CQ, IR, n=13).

Figura 6. Estudio del crecimiento tumoral de melanoma SK28 injertado en ratones desnudos. Arriba: protocolo de tratamiento: 4 tratamientos de DT01 (también denominado CoDbait) combinados con 4 sesiones de irradiación (RT) en dos semanas. Se inyectaron 4 mg de DT01 por vía subcutánea en dos puntos opuestos separados por 5 mm del borde del tumor. Los animales se pretrataron antes del comienzo del tratamiento y durante el tratamiento con DT01+RT con 1 mg de cloroquina (CQ) dos veces por semana mediante administración oral (p.o.)*. Medio: Valor medio del crecimiento tumoral de varios grupos de animales: Sin tratamiento o CQ: sin tratamiento o solo tratado con CQ (n=11); RT o CQ+RT: irradiado con o sin un cotratamiento de cloroquina (n=16); DT01+RT: tratado con DT01 e irradiación (n=10); DT01+CQ+RT: tratado con DT01 con irradiación de cloroquina y (n=12). Abajo: Detalles de los grupos DT01+RT y DT01+CQ+RT. Cada curva corresponde a un crecimiento tumoral.

Figura 7: La actividad de ADN-PK se controló mediante el uso del estuche Sistema de Ensayo de Proteína Cinasa dependiente de ADN SignaTECT (Promega, Madison, WI, Estados Unidos). El sustrato peptídico biotinilado, 50 unidades de ADN-PK (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) y 500 nM de varias moléculas de Dbait se incubaron durante 5 minutos a 30 °C con (γ-32P) ATP de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El sustrato biotinilado se capturó en una membrana de estreptavidina, se lavó y se contó en un contador de centelleo. El porcentaje de fosforilación se calculó dividiendo la radioactividad unida por el recuento total de (γ-32P)ATP por muestra. Dbait32Hc es una molécula de Dbait no conjugada. 0813, 0815, 0902, 0903, 0904 y 0905 son moléculas de Dbait conjugadas (ver las Tablas de "moléculas de Dbait conjugadas alternativas"). Dbait8H es una Dbait corta (8 pb) usada como un control negativo de la actividad de ADN-PK.

Figura 8: Actividad de moléculas de Dbait medida mediante la fosforilación de H2AX. Inmunodetección de γ-H2AX en la línea celular MRC5 24 horas después de la transfección de varias moléculas de Dbait conjugadas (ver las Tablas de "moléculas de Dbait conjugadas alternativas") con o sin tratamiento previo de cloroquina a 50 µM. La Dbait formulada por polietilenimina (PEI) se usó como un control positivo.

Descripción detallada de la invención

La introducción de pequeñas moléculas de ADN (Dbait) afecta la reparación del ADN de los cromosomas dañados y proporciona un método eficiente para mejorar la eficiencia de la radioterapia o la quimioterapia en tumores, en particular en tumores resistentes. Sin embargo, la actividad sensibilizadora de las moléculas de Dbait depende de la eficiencia de su suministro dentro de las células tumorales.

Por lo tanto, los inventores compararon diferentes estrategias para mejorar esta etapa clave. Para probar las estrategias, desarrollaron una cartera de ensayos: (i) análisis molecular de complejos formados con moléculas de Dbait, (ii) pruebas celulares para la absorción y actividad de Dbait, (iii) monitorización con microscopía confocal de embriones vivos de pez cebra para la distribución *in vivo* la actividad biológica de las moléculas formuladas. Estas pruebas permitieron la selección de las formulaciones y protocolos de administración más eficientes antes de los ensayos en tumores xenoinjertados en ratones. Se compararon dos clases de formulaciones: polímeros policationicos con polietilenimina lineal o ramificada (PEI), y colesterol unido covalentemente a Dbait (coDbait). Los complejos de PEI lineal fueron los más eficientes para la transfección de Dbait *in vitro* e *in vivo* pero mostraron una alta toxicidad. De hecho, se requirieron dosis 10 veces mayores de coDbait usado con 1 mg de cloroquina (de acuerdo con la conversión alométrica, equivalente a la dosis profiláctica usada en seres humanos) para observar el mismo efecto antitumoral sobre el melanoma xenoinjertado que Dbait cuando se formuló con PEI. Sin embargo, las dosis probadas de coDbait administrado con cloroquina se encontraron no tóxicas.

En consecuencia, la presente descripción describe la combinación y el protocolo de administración del conjugado colesterol-ácido nucleico con cloroquina administrada por vía sistémica a una dosis clínica relevante, en particular el uso del conjugado colesterol-Dbait con dosis profiláctica de cloroquina (mediante conversión alométrica en animales), sin toxicidad notable. Los inventores demostraron que una cantidad 10 veces mayor (10x) de colesterol-Dbait tiene una potencia similar en comparación con 1x Dbait vectorizado por un sistema de vectores no virales en ratones, en lugar de 1,000 veces sin el uso de la cloroquina descrita en la materia anterior. Esto hace que la conjugación de ácidos nucleicos terapéuticos a un agente lipófilo o de direccionamiento a células sea un sistema de suministro seguro y económicamente utilizable.

En consecuencia, a pesar de la necesidad de una dosis más alta de coDbait, los inventores encontraron sorprendentemente que:

1) La combinación de coDbait con cloroquina presenta una toxicidad baja, si la hay, *in vivo*. Permite mejorar el índice terapéutico (relación de dosis de eficacia/dosis de toxicidad) de casi 1 para Dbait/PEI a > 20 para coDbait; se ha observado la ausencia de toxicidad después de inyección intravenosa, inyección subcutánea e incluso después de inyección intracerebral en ratón, rata, conejo y mono;

2) La combinación de coDbait con cloroquina proporciona una activación retardada y sostenida de ADN-PK (objetivo principal de Dbait) y permite un efecto terapéutico prolongado. Más particularmente, se observa una actividad o efecto creciente a través del período de tiempo;

3) Sorprendentemente, coDbait se difunde bien en tumor/tejido en comparación con Dbait/PEI.

4) Por primera vez, el inventor observó que la cloroquina permite el aumento de la absorción celular de coDbait mientras que este efecto es menos pronunciado con colesterol conjugado a moléculas de siARN.

En base a estas observaciones, la presente descripción se refiere a

- una composición farmacéutica que comprende una molécula de Dbait conjugada o una molécula de ácido nucleico en horquilla como se describe más adelante, y opcionalmente b) un agente anti-tumoral que daña el ADN, y un portador farmacéuticamente aceptable, en particular para el uso en el tratamiento del cáncer;
- un producto o estuche que contiene (a) una molécula de Dbait conjugada o una molécula de ácido nucleico en horquilla como se describe más adelante, y opcionalmente b) un agente anti-tumoral que daña el ADN, como una preparación combinada para el uso simultáneo, separado o secuencial, en particular en el tratamiento del cáncer;
- una composición farmacéutica que comprende una molécula de Dbait conjugada o una molécula de ácido nucleico en horquilla como se describe más adelante, para el uso en el tratamiento del cáncer en combinación con radioterapia y/o un agente anti-tumoral que daña el ADN;
- el uso de una composición farmacéutica que comprende una molécula de Dbait conjugada o una molécula de ácido nucleico en horquilla como se describe más adelante para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en combinación con radioterapia y/o un agente anti-tumoral que daña el ADN o para aumentar la eficiencia del tratamiento del cáncer con radioterapia y/o un agente anti-tumoral que daña el ADN o para potenciar la sensibilidad del tumor a la radioterapia y/o al tratamiento con un agente anti-tumoral que daña el ADN.

Los términos "estuche", "producto" o "preparación combinada", como se usa en la presente descripción, define especialmente un "estuche de partes" en el sentido de que las parejas de combinación (a) y (b), y opcionalmente (c), según se definió anteriormente pueden dosificarse independientemente o mediante el uso de diferentes combinaciones fijadas con cantidades distinguidas de las parejas de combinación (a) y (b), y opcionalmente (c), es decir simultáneamente o en diferentes puntos de tiempo. Las partes del estuche de partes pueden administrarse después, por ejemplo, simultánea o cronológicamente escalonadas, o sea, en puntos de tiempo diferentes y con intervalos de tiempo iguales o diferentes para cualquier parte del estuche de partes. La relación de las cantidades totales de la pareja de combinación (a) con respecto a la pareja de combinación (b), y opcionalmente (c), a administrar en la preparación combinada puede variarse. Las parejas de combinación (a) y (b) y opcionalmente (c), pueden administrarse mediante la misma ruta o por rutas diferentes.

Dentro del contexto de la invención, el término tratamiento indica tratamiento curativo, sintomático y preventivo. Las composiciones farmacéuticas, estuches, productos y preparaciones combinadas de la invención pueden usarse en seres humanos con cáncer o tumor existente, incluso en etapas tempranas o tardías de la progresión del cáncer. Las composiciones farmacéuticas, estuches, productos y preparaciones combinadas de la invención no curarán necesariamente al paciente que tiene el cáncer pero retrasarán o ralentizarán la progresión o evitarán la progresión adicional de la enfermedad, lo que mejora de este modo el estado del paciente. En particular, las composiciones farmacéuticas, estuches, productos y preparaciones combinadas de la invención reducen el desarrollo de tumores, reducen la carga tumoral, producen la regresión tumoral en un huésped mamífero y/o evitan la aparición de metástasis y la recaída del cáncer. En el tratamiento del cáncer, la composición farmacéutica de la invención se administra en una cantidad con eficacia farmacéutica.

Por "cantidad eficaz" se entiende la cantidad de la composición farmacéutica de la invención que evita, elimina o reduce los efectos adversos del cáncer en mamíferos, que incluyen seres humanos, sola o junto con los otros ingredientes activos de la composición farmacéutica, estuche, producto o preparación combinada. Se entiende que la dosis administrada puede adaptarse por los expertos en la materia de acuerdo con el paciente, la patología, el modo de administración, etc.

Cuando se menciona dentro de esta especificación completa "tratamiento de un cáncer" o similar con referencia a la composición farmacéutica de la invención, se entiende: a) un método para tratar un cáncer, dicho método que comprende administrar una composición farmacéutica de la invención a un sujeto que necesita tal tratamiento; b) el uso de una composición farmacéutica de la invención para el tratamiento de un cáncer; c) el uso de una composición

farmacéutica de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer; y/o d) una composición farmacéutica de la invención para el uso en el tratamiento de un cáncer.

Moléculas de Dbait

5 Las moléculas de Dbait se han descrito ampliamente en las solicitudes de patentes PCT WO2005/040378, WO2008/034866 y WO2008/084087.

10 Las moléculas de Dbait pueden definirse mediante un número de características necesarias para su actividad terapéutica, tales como su longitud mínima, la presencia de al menos un extremo libre, y la presencia de una porción bicatenaria, preferentemente una porción de ADN bicatenario. Como se describirá más adelante, es importante señalar que la secuencia de nucleótidos precisa de las moléculas de Dbait no tiene efecto en su actividad. Además, las moléculas de Dbait pueden contener un esqueleto modificado y/o no natural.

15 Preferentemente, las moléculas de Dbait no son de origen humano (es decir, su secuencia de nucleótidos y/o conformación (por ejemplo, horquilla) no existe como tal en una célula humana), con la máxima preferencia de origen sintético. Como la secuencia de las moléculas de Dbait desempeña poco papel, si es que ninguno, las moléculas de Dbait preferentemente no tienen significativo grado de homología o identidad de secuencia a genes, promotores, potenciadores, secuencias corriente arriba 5'- o 3'-, exones, e intrones conocidos. En otras palabras, las moléculas de
20 Dbait tienen menos de 80 % o 70 %, incluso menos de 60 % o 50 % de identidad de secuencia a cualquier gen en un genoma humano. Los métodos para determinar la identidad de secuencia se conocen bien en la materia e incluyen, por ejemplo, BLASTN 2.2.25. Por genoma humano, se considera preferentemente para determinar el porcentaje de identidad el Human Genome Build 37 (referencia GRCh37.p2 y conjuntos alternativos). Las moléculas de Dbait no hibridan, en condiciones rigurosas, con el ADN genómico humano. Las condiciones rigurosas típicas son de manera
25 que permitan la discriminación de los ácidos nucleicos completamente complementarios de los ácidos nucleicos parcialmente complementarios.

Además, la secuencia de las moléculas de Dbait se encuentra preferentemente desprovista de CpG para evitar las reacciones inmunológicas mediadas por receptores tipo toll bien conocidas.

30 La longitud de las moléculas de Dbait puede ser variable, mientras sea suficiente para permitir la unión apropiada del complejo de proteínas Ku que comprende Ku y las proteínas ADN-PKcs. Se ha demostrado que la longitud de las moléculas de Dbait deben ser superiores a 20 pb, preferentemente aproximadamente 32 pb, para asegurar la unión a tal complejo Ku y permitir la activación de ADN-PKcs. Preferentemente, las moléculas de Dbait comprenden entre 20-
35 200 pb, con mayor preferencia 24-100 pb, aún con mayor preferencia 26-100, y con la máxima preferencia entre 32-100 pb. Por ejemplo, las moléculas de Dbait comprenden entre 24-160, 26-150, 28-140, 30-120, o 32-100 pb. Por "pb" se entiende que la molécula comprende una porción bicatenaria de la longitud indicada.

40 En un aspecto particular, las moléculas de Dbait que tienen una porción bicatenaria de al menos 32 pb, o de aproximadamente 32 pb, comprenden la misma secuencia de nucleótidos que Dbait32 (sec. con núm. de ident. 1), Dbait32Ha (sec. con núm. de ident. 2), Dbait32Hb (sec. con núm. de ident. 3), Dbait32Hc (sec. con núm. de ident. 4) o Dbait32Hd (sec. con núm. de ident. 5). Opcionalmente, las moléculas de Dbait tienen la misma composición de nucleótidos que Dbait32, Dbait32Ha, Dbait32Hb, Dbait32Hc o Dbait32Hd pero su secuencia de nucleótidos es diferente. Entonces, las moléculas de Dbait comprenden una cadena de la porción bicatenaria con 3 A, 6 C, 12 G y 11
45 T. Preferentemente, la secuencia de las moléculas de Dbait no contiene ningún dinucleótido CpG.

Alternativamente, la porción bicatenaria comprende al menos 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 o 32 nucleótidos consecutivos de Dbait32 (sec. con núm. de ident. 1), Dbait32Ha (sec. con núm. de ident. 2), Dbait32Hb (sec. con núm. de ident. 3), Dbait32Hc (sec. con núm. de ident. 4) o Dbait32Hd (sec. con núm. de ident. 5). En un aspecto más particular, la porción bicatenaria consiste en 20, 22, 24, 26, 28, 30 o 32 nucleótidos consecutivos de Dbait32 (sec. núm. 1), Dbait32Ha (sec. núm. 2), Dbait32Hb (sec. núm. 3), Dbait32Hc (sec. núm. 4) o Dbait32Hd (sec. núm. 5).

50 Dbait debe tener al menos un extremo libre, como una imitación de DSB. Dicho extremo libre puede ser ya sea un extremo romo libre o un extremo protuberante 5'-/3'-. El "extremo libre" se refiere en la presente a una molécula de ácido nucleico, en particular una porción de ácido nucleico bicatenario, que tiene tanto un extremo 5' como uno 3' o que tiene ya sea un extremo 3' o un extremo 5'. Opcionalmente, uno de los extremos 5' y 3' puede usarse para conjugar la molécula de Dbait o puede enlazarse a un grupo de bloqueo, por ejemplo un enlace nucleotídico 3'-3'.

60 En un aspecto particular, estas contienen dos extremos libres y pueden ser lineales. En consecuencia, las moléculas de Dbait también pueden ser una molécula bicatenaria con dos extremos libres y que tiene la secuencia de nucleótidos de Dbait32 (sec. con núm. de ident. 1), Dbait32Ha (sec. con núm. de ident. 2), Dbait32Hb (sec. con núm. de ident. 3), Dbait32Hc (sec. con núm. de ident. 4) o Dbait32Hd (sec. con núm. de ident. 5).

65 En otro aspecto particular, estas contienen solo un extremo libre. Preferentemente, las moléculas de Dbait están formadas por ácidos nucleicos en horquilla con un tallo de ADN bicatenario y un lazo. El lazo puede ser un ácido nucleico, u otros grupos químicos conocidos por un experto o una mezcla de estos. Un enlazador nucleotídico puede

5 incluir de 2 a 10 nucleótidos, preferentemente, 3, 4 o 5 nucleótidos. Los enlazadores no nucleotídicos incluyen de forma no exhaustiva nucleótido abásico, poliéter, poliamina, poliamida, péptido, carbohidrato, lípido, polihidrocarburo, u otros compuestos poliméricos (por ejemplo oligoetilenglicoles tales como lo que tienen entre 2 y 10 unidades de etilenglicol, preferentemente 4, 5, 6, 7 u 8 unidades de etilenglicol). Un enlazador preferido se selecciona del grupo
10 que consiste en hexaetilenglicol, tetradexoxitimidilato (T4) y otros enlazadores tales como 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano. En consecuencia, en un aspecto particular, las moléculas de Dbait pueden ser una molécula en horquilla que tiene una porción bicatenaria o tallo que comprende al menos 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 o 32 nucleótidos consecutivos de Dbait32 (sec. núm. 1), Dbait32Ha (sec. núm. 2), Dbait32Hb (sec. núm. 3), Dbait32Hc (sec. núm. 4) o Dbait32Hd (sec. núm. 5) y un lazo que es un enlazador de hexaetilenglicol, un enlazador de tetradexoxitimidilato (T4) o 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano. En un aspecto más particular, las moléculas de Dbait pueden tener una porción bicatenaria que consiste en 20, 22, 24, 26, 28, 30 o 32 nucleótidos consecutivos de Dbait32 (sec. núm. 1), Dbait32Ha (sec. núm. 2), Dbait32Hb (sec. núm. 3), Dbait32Hc (sec. núm. 4) o Dbait32Hd (sec. núm. 5).

15 Las moléculas de Dbait comprenden preferentemente un esqueleto de 2'-desoxinucleótido, y opcionalmente comprenden uno o varios nucleótidos y/o nucleobases (2, 3, 4, 5 o 6) modificadas diferentes de adenina, citosina, guanina y timina. En consecuencia, las moléculas de Dbait son esencialmente una estructura de ADN. En particular, la porción o tallo bicatenario de las moléculas de Dbait están formadas por desoxirribonucleótidos.

20 Las moléculas de Dbait preferidas comprenden uno o varios nucleótido(s) o grupo(s) modificado(s) químicamente en el extremo de una o de cada cadena, en particular para protegerlas de la degradación. En un aspecto preferido particular, el(los) extremo(s) libre(s) de las moléculas de Dbait se protege(n) por uno, dos o tres esqueletos de fosfodiéster modificados en el extremo de una o de cada cadena. Los grupos químicos preferidos, en particular el esqueleto de fosfodiéster modificado, comprenden fosforotioatos. Alternativamente, la molécula de Dbait preferida
25 tiene enlace nucleotídico 3'-3', o nucleótidos con esqueleto de metilfosfonato. Otros esqueletos modificados se conocen bien en la materia y comprenden fosforamidatos, ácido nucleico morfolino, ácido nucleico bloqueado en puente 2'-0,4'-C metileno/etileno (PNA), y enlaces interazúcar de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, o enlaces intraazúcar heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta de longitud variable, o cualquiera de los nucleótidos modificados conocidos por un experto. En un primer aspecto preferido, las moléculas de Dbait tiene el(los) extremo(s)
30 libre(s) protegido(s) por uno, dos o tres esqueletos de fosfodiéster modificados en el extremo de uno o más de cada cadena, con mayor preferencia por tres esqueletos de fosfodiéster modificados (en particular fosforotioato o metilfosfonato) al menos en el extremo 3', pero aún con mayor preferencia en ambos extremos 5' y 3'.

35 En un aspecto más preferido, la molécula de Dbait es una molécula de ácido nucleico en horquilla que comprende una porción o tallo bicatenario de ADN de 32 pb (por ejemplo, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident. 1-5, en particular la sec. con núm. de ident. 4) y un lazo que enlaza las dos cadenas de la porción o tallo bicatenario de ADN que comprende o consiste en un enlazador seleccionado del grupo que consiste en hexaetilenglicol, tetradexoxitimidilato (T4) y 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano, los extremos libres de la porción o tallo bicatenario de ADN (es decir en el lado opuesto del lazo) que tienen tres esqueletos de fosfodiéster modificados (en particular enlaces internucleotídicos de fosforotioato).
40

45 Dichas moléculas de Dbait se forman mediante síntesis química, semi-biosíntesis o biosíntesis, cualquier método de amplificación, seguido por cualquiera de los métodos de extracción y preparación y cualquier modificación química. Los enlazadores se proporcionan para que puedan incorporarse mediante síntesis química estándar de ácidos nucleicos.

50 Con mayor preferencia, las moléculas de Dbait se elaboran mediante síntesis convergente especialmente diseñada: dos cadenas complementarias se preparan mediante síntesis química estándar de ácidos nucleicos con la incorporación de un precursor de enlazador apropiado, después de su purificación, se acoplan covalentemente entre sí.

Moléculas de Dbait conjugadas

55 La presente descripción se refiere a moléculas de Dbait conjugadas a moléculas que facilitan la endocitosis o la absorción celular.

60 En particular, las moléculas pueden ser moléculas lipófilas tales como colesterol, ácidos grasos de cadena simple o doble, o ligandos cuyo receptor de células objetivo que permiten la endocitosis mediada por receptores, tales como ácido fólico y derivados de folato o transferrina (Goldstein y otros Ann. Rev. Cell Biol. 1985 1:1-39; Leamon & Lowe, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos. 1991, 88: 5572-5576.). Los ácidos grasos pueden ser saturados o no saturados y serlo en C₄-C₂₈, preferentemente en C₁₄-C₂₂, aún con mayor preferencia que en C₁₈ tales como ácido oleico o ácido esteárico. En particular, los ácidos grasos pueden ser octadecil o dioleoil. Los ácidos grasos pueden encontrarse como forma de cadena doble enlazada con un enlazador apropiado tal como un glicerol, una fosfatidilcolina o etanolamina o unidos entre sí por los enlazadores usados para unir en la molécula de Dbait. Como se usa en la presente, el término
65 "folato" se refiere a folato y derivados de folato, que incluyen derivados y análogos de ácido pterico. Los análogos y derivados de ácido fólico adecuados para el uso en la presente descripción incluyen antifolatos, dihidrofolatos,

tetrahidrofolatos, ácido fólico, ácido pteropoliglutámico, folatos 1-deaza, 3-deaza, 5-deaza, 8-deaza, 10-deaza, 1,5-deaza, 5,10-dideaza, 8,10-dideaza y 5,8-dideaza, antifolatos y derivados de ácido pterico. Los análogos de folato adicionales se describen en el documento US2004/242582. La molécula que facilita la endocitosis puede ser tocoferol, azúcar tal como galactosa y manosa y su oligosacárido, péptido tal como RGD y bombesina, y proteínas tales como integrina. En consecuencia, la molécula que facilita la endocitosis puede seleccionarse del grupo que consiste en ácidos grasos de cadena simple o doble, folatos y colesterol. Con mayor preferencia, la molécula que facilita la endocitosis se selecciona del grupo que consiste en dioleoil, octadecil, ácido fólico, y colesterol. En una modalidad más preferida, la molécula de Dbait se conjuga a un colesterol.

Las moléculas que facilitan la endocitosis se conjugan a las moléculas de Dbait, preferentemente mediante un enlazador. Cualquier enlazador conocido en la materia puede usarse para unir covalentemente la molécula que facilita la endocitosis a las moléculas de Dbait. Por ejemplo, el documento WO09/126933 proporciona una amplia revisión de los enlazadores convenientes en las páginas 38-45. El enlazador puede ser de forma no exhaustiva, cadena alifática, poliéter, poliamina, poliamida, péptido, carbohidrato, lípido, polihidrocarburo, u otros compuestos poliméricos (por ejemplo, oligoetilenglicoles tales como los que tienen entre 2 y 10 unidades de etilenglicol, preferentemente 3, 4, 5, 6, 7 u 8 unidades de etilenglicol, aún más preferentemente 6 unidades de etilenglicol), así como también que incorporan cualquiera de los enlaces que pueden descomponerse por vía química o enzimática, tal como un enlace disulfuro, un enlace disulfuro protegido, un ácido enlace lábil a ácido (por ejemplo, enlace de hidrazona), un enlace de éster, un enlace de ortoéster, un enlace de fosfonamida, un enlace de péptido bioescindible, un enlace azo o un enlace de aldehído. Tales enlazadores escindibles se detallan en el documento WO2007/040469 páginas 12-14, en el documento WO2008/022309 páginas 22-28.

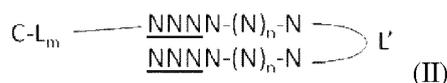
En un aspecto particular, la molécula de Dbait puede enlazarse a una molécula que facilita la endocitosis. Alternativamente, varias moléculas que facilitan la endocitosis (por ejemplo, dos, tres o cuatro) pueden unirse a una molécula de Dbait.

En un aspecto específico, el enlazador entre la molécula que facilita la endocitosis, en particular colesterol, y la molécula de Dbait es $\text{CO-NH-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_n$, en donde n es un número entero de 1 a 10, preferentemente n se selecciona del grupo que consiste en 3, 4, 5 y 6. En un aspecto muy particular, el enlazador es $\text{CO-NH-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_4$ (carboxamido trietilenglicol). El enlazador puede enlazarse a las moléculas de Dbait en cualquier posición conveniente que no modifica la actividad de las moléculas de Dbait. En particular, el enlazador puede enlazarse en el extremo 5', en el extremo 3' o en el lazo cuando la molécula de Dbait es una horquilla. Sin embargo, en el caso de una molécula de Dbait en horquilla, los inventores encontraron sorprendentemente que el colesterol enlazado a la molécula de Dbait mediante un enlazador en su extremo 5' es más eficiente que el colesterol enlazado a la molécula de Dbait mediante un enlazador en el lazo. Por lo tanto, en un aspecto preferido, la molécula de Dbait conjugada contemplada es una molécula de Dbait que tiene una estructura en horquilla y que se conjuga a la molécula que facilita la endocitosis, preferentemente mediante un enlazador, en su extremo 5'.

En otro aspecto específico, el enlazador entre la molécula que facilita la endocitosis, en particular colesterol, y la molécula de Dbait es dialquil-disulfuro {por ejemplo, $(\text{CH}_2)_p\text{-S-S-(CH}_2)_q$ con p y q que es un número entero de 1 a 10, preferentemente de 3 a 8, por ejemplo 6}.

En un aspecto más preferido, la molécula de Dbait conjugada es una molécula de ácido nucleico en horquilla que comprende una porción o tallo bicatenario de ADN de 32 pb (por ejemplo, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident. 1-5, en particular la sec. con núm. de ident. 4) y un lazo que enlaza las dos cadenas de la porción o tallo bicatenario de ADN que comprende o consiste en un enlazador seleccionado del grupo que consiste en hexaetilenglicol, tetradesoximidilato (T4) y 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxononadecano, los extremo libres de la porción o tallo bicatenario de ADN (es decir en el lado opuesto del lazo) que tienen tres esqueletos de fosfodiéster modificados (en particular enlaces internucleotídicos fosforotioato) y dicha molécula de Dbait que se conjuga a un colesterol en su extremo 5', preferentemente mediante un enlazador (por ejemplo carboxamido oligoetilenglicol, preferentemente carboxamido trietilenglicol).

La molécula de Dbait conjugada o molécula de ácido nucleico en horquilla puede describirse además por la fórmula:



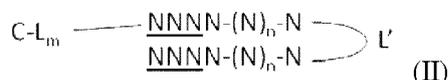
en donde N es un nucleótido, n es un número entero mayor que 14, la N subrayada se refiere a un nucleótido que tiene o no un esqueleto de fosfodiéster modificado, L' es un enlazador, C es una molécula que facilita la endocitosis, L es un enlazador, m es un número entero que es 0 o 1. Preferentemente, la N subrayada se refiere a un nucleótido que tiene un esqueleto de fosfodiéster modificado. En la Fórmula (II), C-L_m se enlaza respectivamente al extremo 5' o al extremo 3' del nucleótido. En la fórmula (II), C-L_m se enlaza preferentemente a L' mediante un enlace disulfuro (S-S).

En aspectos preferidos, la molécula de la formula (II) tiene una o varias de las siguientes características:

- N es un desoxinucleótido, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en A (adenina), C (citosa), T (timina) y G (guanina) y seleccionado para evitar la aparición de un dinucleótido CpG y para tener menos de 80 % o 70 %, incluso menos de 60 % o 50 % de identidad de secuencia a cualquier gen en un genoma humano; y/o,
- 5 - n es un número entero de 15 a 195, preferentemente de 19-95, más preferentemente de 21 a 95, y aún más preferentemente de 27 a 95. En un aspecto preferido particular, n es 27; y/o,
- la N subrayada se refiere a un nucleótido que tiene un esqueleto de fosforotioato o metilfosfonato, con mayor preferencia un esqueleto de fosforotioato; y/o,
- 10 - el L' enlazado se selecciona del grupo que consiste en hexaetilenglicol, tetradexoitimidilato (T4) y 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano; y/o,
- m es 1 y L es un carboxamido oligoetilenglicol, con mayor preferencia carboxamido trietilenglicol; y/o,
- C se selecciona del grupo que consiste en un colesterol, ácidos grasos de cadena simple o doble tales como ácido oleico o ácido esteárico, o ligando (que incluye péptido, proteína, aptámero) que se dirige al receptor celular tal como folato y transferrina, es preferentemente un colesterol, octadecilo, dioleilo o folato, con mayor
- 15 preferencia es un colesterol.

Preferentemente, C-L_m es un radical (10-O-[1-propil-3-N-carbamoilcolesteril]-trietilenglicol enlazador de trietilenglicol.

20 En un aspecto preferido, la molécula de Dbait conjugada o molécula de ácido nucleico en horquilla tiene la siguiente fórmula:

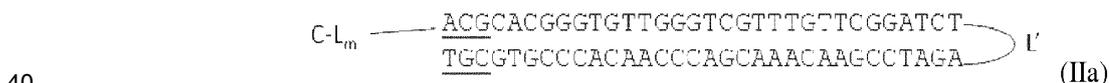


25 con la misma definición que la fórmula (II) para N, N subrayada, n, L, L', C y m.

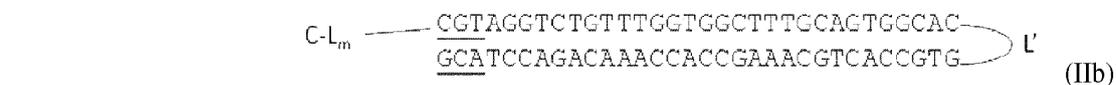
En un aspecto preferido, NNNN-(N)_n-N comprende al menos 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 o 32 nucleótidos consecutivos de Dbait32 (sec. con núm. de ident. 1), Dbait32Ha (sec. con núm. de ident. 2), Dbait32Hb (sec. con núm. de ident. 3), Dbait32Hc (sec. con núm. de ident. 4) o Dbait32Hd (sec. con núm. de ident. 5) o consiste en 20, 22, 24, 26, 28, 30 o 32 nucleótidos consecutivos de Dbait32 (sec. con núm. de ident. 1), Dbait32Ha (sec. con núm. de ident. 2), Dbait32Hb (sec. con núm. de ident. 3), Dbait32Hc (sec. con núm. de ident. 4) o Dbait32Hd (sec. con núm. de ident. 5). En un aspecto particular, NNNN-(N)_n-N comprende o consiste en Dbait32 (sec. con núm. de ident. 1), Dbait32Ha (sec. con núm. de ident. 2), Dbait32Hb (sec. con núm. de ident. 3), Dbait32Hc (sec. con núm. de ident. 4) o Dbait32Hd (sec. con núm. de ident. 5), con mayor preferencia Dbait32Hc (sec. con núm. de ident. 4).

35 En consecuencia, la molécula de Dbait conjugada o la molécula de ácido nucleico en horquilla puede seleccionarse del grupo que consiste en:

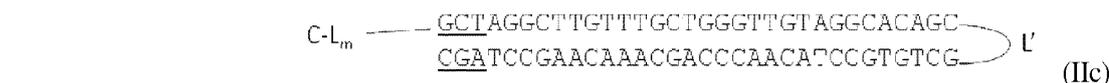
con NNNN-(N)_n-N que es la sec. con núm. de ident. 1



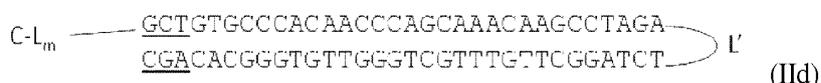
con NNNN-(N)_n-N que es la sec. con núm. de ident. 2



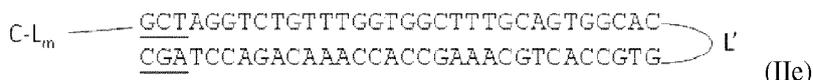
con NNNN-(N)_n-N que es la sec. con núm. de ident. 3



50 con NNNN-(N)_n-N que es la sec. con núm. de ident. 4



con NNNN-(N)_n-N que es la sec. con núm. de ident. 5 y



con la misma definición que las fórmulas (I), (II) y (III) para L, L', C y m.

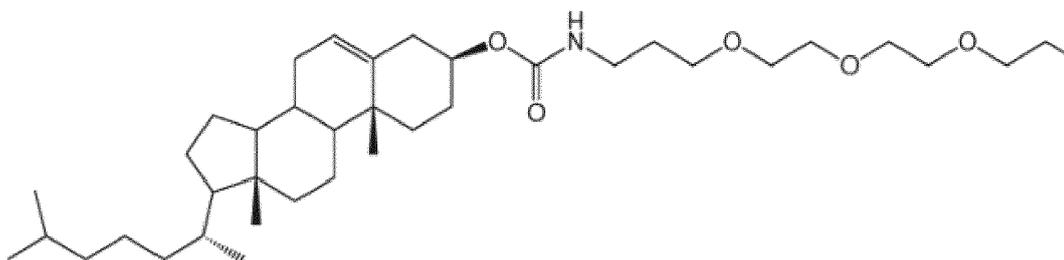
En aspectos preferidos, la molécula de las fórmulas (IIa), (IIb) (IIc), (II d), y (IIe) tiene una o varias de las siguientes características:

- el nucleótido subrayado se refiere a un nucleótido que tiene o no un esqueleto de fosforotioato o metilfosfonato, con mayor preferencia un nucleótido que tiene un esqueleto de fosforotioato o metilfosfonato, aún con mayor preferencia un nucleótido que tiene un esqueleto de fosforotioato; y/o,
- el L' enlazado se selecciona del grupo que consiste en hexaetilenglicol, tetradexoitimidilato (T4) y 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano; y/o,
- m es 1 y L es un carboxamido oligoetilenglicol, con mayor preferencia carboxamido trietilenglicol; y/o,
- C se selecciona del grupo que consiste en un colesterol, ácidos grasos de cadena simple o doble tales como ácido oleico o ácido esteárico, o ligando (que incluye péptido, proteína, aptámero) que se dirige al receptor celular tal como folato, transferrina, preferentemente es un colesterol, octadecil, dioleoil o folato, con mayor preferencia es un colesterol.

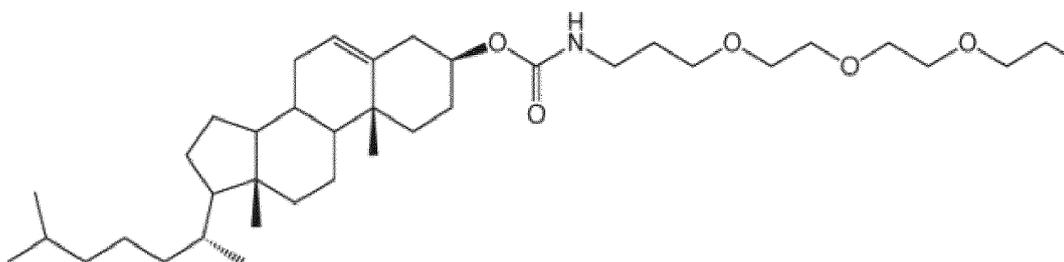
Preferentemente, C-L_m es un radical (10-O-[1-propil-3-N-carbamoilcolesteril]-trietilenglicol enlazador de trietilenglicol.

En un aspecto específico de las moléculas de Dbait o moléculas de ácido nucleico en horquilla de las fórmulas (II), (IIa), (IIb), (IIc), (II d) y (IIe), L' se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en hexaetilenglicol, tetradexoitimidilato (T4) y 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano.

En un aspecto específico de las moléculas de Dbait o moléculas de ácido nucleico en horquilla de las fórmulas (II), (IIa), (IIb), (IIc), (II d) y (IIe), con C que es colesterol, C-L_m es el radical

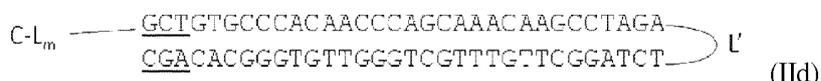


En un aspecto preferido, la molécula de Dbait conjugada o molécula de ácido nucleico en horquilla se selecciona del grupo que consiste en (II), (IIa), (IIb), (IIc), (II d), y (IIe), en donde C-L_m que es el radical

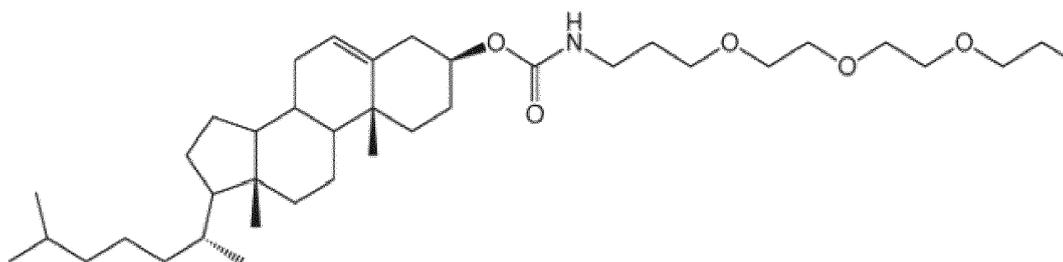


y en donde L' se selecciona preferentemente del grupo que consiste en hexaetilenglicol, tetradexoitimidilato (T4) y 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano, con mayor preferencia 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano.

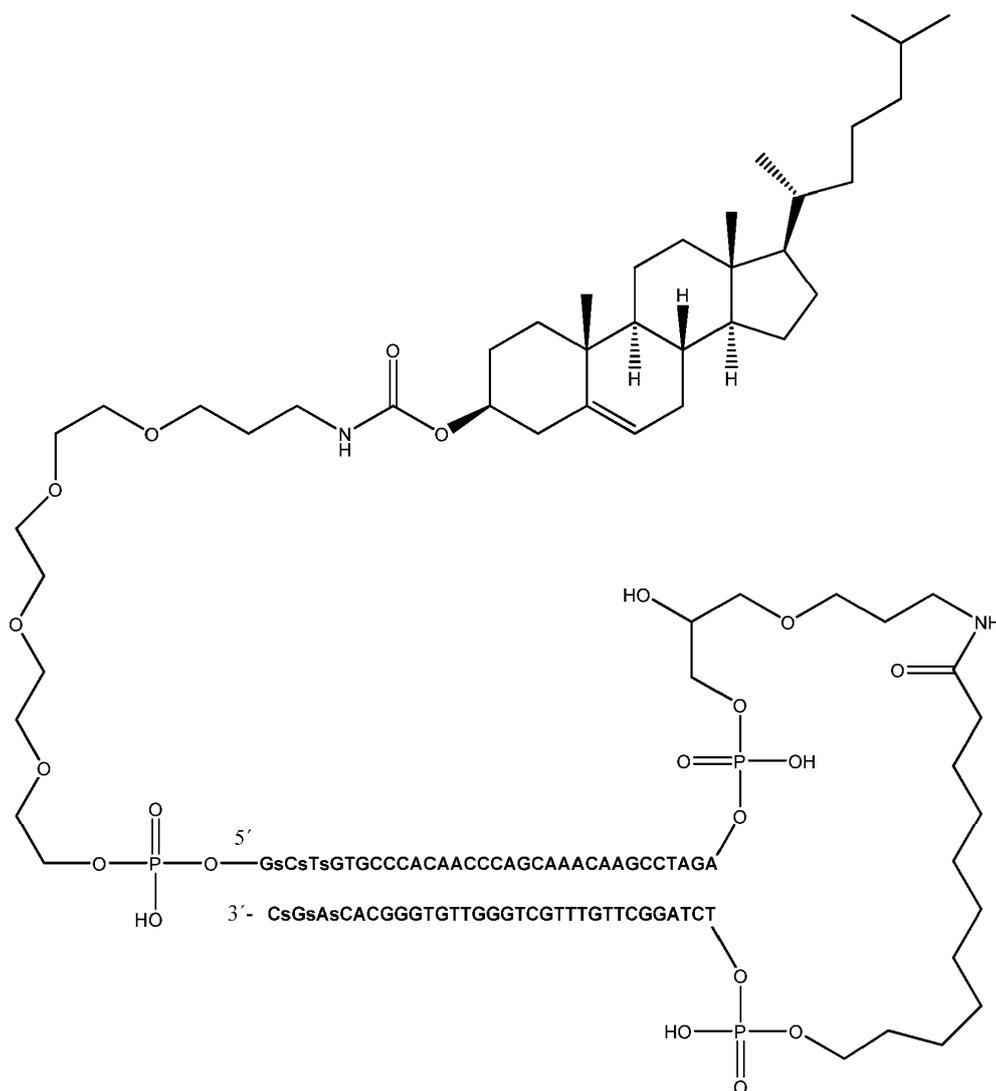
En una modalidad muy específica, la molécula de Dbait o molécula de ácido nucleico en horquilla tiene la siguiente fórmula



en donde C-L_m es el radical



5 en donde L' es 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano y en donde los nucleótidos subrayados tienen un esqueleto de fosforotioato. En consecuencia, la molécula tiene la siguiente estructura y se refiere en la sección de Ejemplos como "coDbait".



10 Uno de los conjugados de colesterol-Dbait, denominado DT01, es un oligodesoxirribonucleótido de 64-nt que consiste en dos cadenas de 32-nt de secuencia complementaria conectada mediante un enlazador 1,19-bis(fosfo)-8-hidraza-2-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano, con un tetraetilenglicol colesteril en el extremo 5' y 3 enlaces internucleótidos fosforotioato en cada uno de los extremos 5' y 3'. En solución, la molécula forma una doble hélice de 32-bp en horquilla intramolecul

15 de. Esta estructura de ADN bicatenaria (ds) es esencial para su actividad biológica, y es el ingrediente farmacéutico activo (API). Fórmula molecular de la sal de sodio: $C_{678}H_{820}N_{244}Na_{65}O_{392}P_{65}S_6$; Peso molecular de la sal de sodio: 22359,2 Da; Peso molecular del ácido libre: 20931,4 Da. La molécula también puede representarse como sigue:



Un aspecto muy sorprendente de la presente descripción para la molécula de la fórmula (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId) o (IIe) es que, aunque la actividad de las moléculas de Dbait necesita la presencia de al menos un extremo libre, la moléculas que facilitan la endocitosis enlazada al extremo 5' no disminuye la actividad.

En consecuencia, la presente invención se refiere además a una molécula de Dbait conjugada como se describe anteriormente, una composición farmacéutica que la comprende y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable, una molécula de Dbait conjugada como se describió anteriormente para el uso en el tratamiento del cáncer, sola o junto con radioterapia y/o quimioterapia de un agente antitumoral que daña el ADN como se detalla más adelante.

Tratamiento que daña el ADN

Además de las moléculas de Dbait conjugadas y del agente endosomolítico, el tratamiento puede comprender además un tratamiento antitumoral, preferentemente un tratamiento mediante un agente que daña el ADN o radioterapia. El tratamiento que daña el ADN puede ser radioterapia o quimioterapia con un agente antitumoral que daña el ADN, o una combinación de estos.

La ruptura de la cadena de ADN puede lograrse mediante radiación ionizada (radioterapia). La radioterapia incluye rayos γ , rayos X, y/o el suministro directo de radioisótopos a células tumorales. Otras radioterapias incluyen microondas e irradiación UV. Otros enfoques para terapia de radiación se contemplan además en la presente invención.

El agente antitumoral que daña el ADN se selecciona preferentemente del grupo que consiste en un inhibidor de topoisomerasas I o II, un agente reticulante de ADN, un agente alquilante de ADN, un agente antimetabólico e inhibidores de los husos mitóticos.

Los inhibidores de topoisomerasas I y/o II incluyen etopósido, topotecán, camptotecina, irinotecán, amsacrina, intoplicina, antraciclinas tales como doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina, idanrrubicina y mitoxantrona. Los inhibidores de Topoisomerasa I y II incluyen intoplecin.

Los agentes reticulantes de ADN incluyen cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.

Los agentes antimetabólicos bloquean las enzimas responsables de la síntesis de ácido nucleico o se incorporan en el ADN, lo que produce un código genético incorrecto y conduce a la apoptosis. Los ejemplos no exhaustivos de estos incluyen, sin limitación, antagonistas de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de adenosina desaminasa, y más particularmente Metotrexato, Floxuridina, Citarabina, 6-Mercaptopurina, 6- Tioguanina, Fludarabina fosfato, Pentostatina, 5-fluorouracil, gemcitabina y capecitabina.

El agente anti-tumoral que daña el ADN puede ser agentes alquilantes que incluyen, sin limitación, mostazas nitrogenadas, derivados de etilenimina, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas, sales metálicas y triazenos. Los ejemplos no exhaustivos de estos incluyen mostaza Uracilo, Clormetina, Ciclofosfamida (CYTOXAN(R)), Ifosfamida, Melfalán, Cloramubicil, Pipobroman, Trietilenmelamina, Trietilentiofosforamine, Busulfán, Carmustina, Lomustina, Fotemustina, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, tiotepa, Streptozocin, Dacarbazina, y Temozolomida.

Los inhibidores de los husos mitóticos incluyen paclitaxel, docetaxel, vinorelbina, larotaxel (también denominado XRP9881; Sanofi-Aventis), XRP6258 (Sanofi-Aventis), BMS-184476 (Bristol-Meyer-Squibb), BMS-188797 (Bristol-Meyer-Squibb), BMS-275183 (Bristol-Meyer-Squibb), ortataxel (también denominado IDN 5109, BAY 59-8862 o SB-T-101131; Bristol-Meyer-Squibb), RPR 109881A (Bristol-Meyer-Squibb), RPR 116258 (Bristol-Meyer-Squibb), NBT-287 (TAPESTRY), PG-paclitaxel (también denominado CT-2103, PPX, paclitaxel poliglumex, paclitaxel poliglutamato o Xyotax™), ABRAXANE® (también denominado Nab-Paclitaxel; ABRAXIS BIOSCIENCE), Tesetaxel (también denominado DJ-927), IDN 5390 (INDENA), Taxoprexin (también denominado ácido docosahexanoico-paclitaxel; PROTARGA), DHA-paclitaxel (también denominado Taxoprexin®), y MAC-321 (WYETH). Ver además la revisión de Hennenfent & Govindan (2006, Annals of Oncology, 17, 735-749).

Cánceres o tumores a tratar

Las composiciones farmacéuticas y los productos, estuches o preparación combinada descritos en la descripción pueden usarse para tratar el cáncer en un sujeto.

Los términos "cáncer", "canceroso" o "maligno" se refieren o describen el estado fisiológico en mamíferos que se caracterizan típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, por ejemplo, leucemia, linfoma, blastoma, carcinoma y sarcoma. Los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda positiva a cromosoma de Filadelfia (Ph+ ALL), carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cérvix, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon, y cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumor de células germinales, sarcoma pediátrico, asenino natural sinonasal, mieloma múltiple, leucemia mielogénica aguda (AML), leucemia linfocítica crónica, mastocitosis y cualquier síntoma asociado a mastocitosis.

"Leucemia" se refiere a enfermedades malignas, progresivas de los órganos formadores de sangre y se caracteriza generalmente por una proliferación y desarrollo distorsionados de leucocitos y su precursores en la sangre y médula ósea. Generalmente la leucemia se clasifica clínicamente sobre la base de (1) la duración y el carácter de la enfermedad-aguda o crónica; (2) el tipo de célula implicada; mieloide (mielogénica), linfoide (linfogénica) o monocítica; y (3) el aumento o no aumento del número de células anormales en la sangre-leucémica o aleucémica (subleucémica). La leucemia incluye, por ejemplo, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, leucemia granulocítica crónica, leucemia promielocítica aguda, leucemia de células T adultas, leucemia aleucémica, una leucemia leucocitémica, leucemia basofilia, leucemia de blastocitos, leucemia bovina, leucemia mielocítica crónica, leucemia cutis, leucemia embrionaria, leucemia eosinofílica, leucemia de Gross, leucemia de células pilosas, leucemia hemoblástica, leucemia hemocitoblástica, leucemia histiocítica, leucemia de células madre, leucemia monocítica aguda, leucemia leucopénica, leucemia linfática, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia linfógena, leucemia linfoide, leucemia de células de linfosarcoma, leucemia de mastocitos, leucemia de megacariocitos, leucemia micromieloblástica, leucemia monocítica, leucemia mieloblástica, leucemia mielocítica, leucemia granulocítica mieloide, leucemia mielomonocítica, leucemia Naegeli, leucemia de células plasmáticas, leucemia plasmacítica, leucemia promielocítica, leucemia de células de Rieder, leucemia de Schilling, leucemia de células madre, leucemia subleucémica y leucemia de células indiferenciadas. En determinados aspectos, la presente invención proporciona tratamiento para la leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, y/o leucemia linfoblástica aguda positiva a cromosoma de Filadelfia (Ph+ ALL).

Diversos cánceres también son abarcados por el alcance de la invención, que incluyen los siguientes: carcinoma que incluyen los de vejiga (que incluye cáncer de vejiga acelerado y metastásico), mama, colon (que incluyen cáncer colorrectal), riñón, hígado, pulmón (que incluyen cáncer de pulmón de células pequeñas y de células no pequeñas y adenocarcinoma de pulmón), ovario, próstata, testículos, tracto genitourinario, sistema linfático, recto, laringe, páncreas (que incluyen carcinoma pancreático exocrino), esófago, estómago, vejiga biliar, cérvix, tiroides, y piel (que incluyen carcinoma de células escamosas); tumores hematopoyéticos de linaje linfoide que incluyen leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkins, linfoma de no Hodgkins, linfoma de células pilosas, linfoma histiocítico, y linfoma de Burketts; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide que incluyen leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide, y leucemia promielocítica; tumores del sistema nervioso central y periférico que incluyen astrocitoma, neuroblastoma, glioma, y schwannomas; tumores de origen mesenquimal que incluyen fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, y osteosarcoma; otros tumores que incluyen melanoma, xenoderma pigmentosum, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides, y teratocarcinoma; melanoma, melanoma maligno no extraíble en etapa III o IV, carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cérvix, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon, y cáncer de cabeza y cuello, retinoblastoma, cáncer gástrico, tumor de células germinales, cáncer de huesos, tumores de huesos, histiocitoma fibroso maligno de hueso de adultos; histiocitoma fibroso maligno de hueso de adultos de infantes, sarcoma, sarcoma pediátrico, asenino natural sinonasal, neoplasmas, neoplasma de células plasmáticas; síndromes mielodisplásicos; neuroblastoma; tumor testicular de células germinales, melanoma intraocular, síndromes mielodisplásicos; enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, sarcoma sinovial. Además, los trastornos incluyen urticaria pigmentosa, mastocitosis tales como mastocitosis cutánea difusa, mastocitoma solitario en seres humanos, así como también mastocitoma de perro y algunos subtipos raros como mastocitosis bullosa, eritrodérmica y teleangiectásica, mastocitosis con un trastorno hematológico asociado, tal como un síndrome mieloproliferativo o mielodisplásico o leucemia aguda, trastorno mieloproliferativo asociado con mastocitosis, leucemia de células cebadas, además de otros cánceres. Diversos cánceres también se incluyen dentro del alcance de la invención, de trastornos que incluyen los siguientes: carcinoma, que incluyen los de vejiga, carcinoma urotelial, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cérvix, tiroides, testículos, en particular seminomas testiculares, y piel; que incluyen carcinoma de células escamosas; tumores de estromas gastrointestinales ("GIST"); tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, que incluyen leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkins, linfoma de no Hodgkins, linfoma de células pilosas y linfoma de Burketts; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, que incluyen leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimal, que incluyen fibrosarcoma y rabdomiosarcoma; otros tumores, que incluyen melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma;

tumores del sistema nervioso central y periférico, que incluyen astrocitoma, neuroblastoma, glioma, y schwannomas; tumores de origen mesenquimal, que incluyen fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, y osteosarcoma; y otros tumores, que incluyen melanoma, xenoderma pigmentosum, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides, teratocarcinoma, tumores de células germinales no seminomatosas resistentes a quimioterapia, y sarcoma de Kaposi, y cualquier metástasis de estos.

En un aspecto preferido, el cáncer es un tumor sólido. La expresión "tumor sólido" significa especialmente cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer del colon y generalmente del tracto GI (gastrointestinal), cáncer de cérvix, cáncer de pulmón, en particular cáncer de pulmón de células pequeñas, y cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer de la próstata o sarcoma de Kaposi.

Las composiciones farmacéuticas y los productos, estuches o preparaciones combinadas descritos en la invención pueden ser útiles para inhibir el crecimiento de tumores sólidos, disminuir el volumen del tumor, evitar la expansión metastásica de tumores y el crecimiento o el desarrollo de micrometástasis. Las composiciones farmacéuticas y los productos, estuches o preparaciones combinadas descritas en la invención son adecuados en particular para el tratamiento de pacientes de pobre pronóstico o tumores resistentes a radio o quimio.

Los inventores probaron un gran número de tipos tumorales diferentes de cada tumor (que incluyen melanomas, glioblastomas, carcinomas) a partir de líneas celulares y biopsias de pacientes. Más del 80 % de estos respondieron bien al tratamiento. En particular, la eficiencia se ha observado para los siguientes tipos tumorales: melanoma, glioblastoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado y cáncer de cabeza y cuello.

En un aspecto preferido, el cáncer puede seleccionarse de melanoma, glioblastoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado y cáncer de cabeza y cuello.

Régimen, dosificación y rutas de administración

La dosificación eficaz de cada una de las parejas de combinación empleadas en la preparación combinada de la invención puede variar en dependencia del compuesto o composición farmacéutica particular empleada, el modo de administración, la afección que se trata, la gravedad de la afección que se trata. Por lo tanto, el régimen de dosificación de la preparación combinada de la invención se selecciona de acuerdo con una variedad de factores que incluyen la ruta de administración y el estado del paciente. Un médico, un clínico o un veterinario con experiencia puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de los ingredientes activos individuales necesarios para evitar, contrarrestar o detener el progreso de la afección. La precisión óptima para lograr la concentración de los ingredientes activos dentro del intervalo que rinde eficacia sin toxicidad requiere un régimen en base a las cinéticas de la disponibilidad de ingredientes activos a los sitios objetivo.

La ruta de administración de las moléculas de Dbait conjugadas puede ser oral, parental, intravenosa, intratumoral, subcutánea, intracranial, intraarterial, tópica, rectal, transdérmica, intradérmica, nasal, intramuscular, intraperitoneal, e intraósea. En un aspecto preferido, las moléculas de Dbait conjugadas son para que se administren o inyecten cerca del(de los) sitio(s) tumoral(es) a tratar.

La ruta de administración para el agente antitumoral que daña el ADN puede ser oral, parenteral, intravenosa, intratumoral, subcutánea, intracranial, intraarterial, tópica, rectal, transdérmica, intradérmica, nasal, intramuscular, intraósea.

Una vez que ha comenzado el tratamiento mediante radioterapia o con el agente antitumoral que daña el ADN, el tratamiento con las moléculas de Dbait conjugadas puede continuar mientras el tratamiento mediante radioterapia o con el agente antitumoral que daña el ADN sea para que se aplique o se administre. Alternativamente, el tratamiento con las moléculas de Dbait conjugadas también puede terminar.

Para las moléculas de Dbait conjugadas, la dosificación eficaz del agente antitumoral que daña el ADN empleado en la preparación combinada, estuche o producto de la invención puede variar en dependencia del modo de administración, la afección que se trata, la gravedad de la afección que se trata. Por lo tanto, el régimen de dosificación de las moléculas de Dbait conjugadas se selecciona de acuerdo con una variedad de factores que incluyen la ruta de administración y el estado del paciente. Un médico, un clínico o un veterinario con experiencia puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de las moléculas de Dbait conjugadas necesaria para evitar, contrarrestar o detener el progreso del cáncer, en particular junto con el tratamiento que daña el ADN.

Por ejemplo, para la administración local (por ejemplo, cuando se usa la administración intratumoral o subcutánea), la cantidad eficiente de las moléculas de Dbait conjugadas es al menos 0,01 mg por 1 cm³ de tumor, preferentemente 0,1 - 40 mg por 1 cm³ de tumor, con la máxima preferencia 1-20 mg por 1 cm³ de tumor. La cantidad eficiente puede administrarse en un protocolo de tratamiento diario (por ejemplo, 5 días por semana durante 3 a 6 semanas consecutivas o 3 veces a la semana durante 3 a 6 semanas consecutivas). Alternativamente, una cantidad eficiente de al menos 0,1 mg por 1 cm³ de tumor, preferentemente 0,1 - 40 mg por 1 cm³ de tumor, con la máxima preferencia 1-20 mg por 1 cm³ de tumor, puede administrarse en un protocolo de tratamiento semanal durante 3-6 semanas

consecutivas, por ejemplo. Cuando se usan otras rutas de administración, el experto en la materia puede adaptar la cantidad para obtener una cantidad eficiente de las moléculas de Dbait conjugadas en el tumor de al menos 0,01 mg por 1 cm³ de tumor, preferentemente 0,1 - 40 mg por 1 cm³ de tumor, con la máxima preferencia 1-20 mg por 1 cm³ de tumor, en particular en un protocolo de tratamiento diario o en un protocolo de tratamiento semanal. Por ejemplo, para una ruta sistémica, la cantidad eficiente o dosificación unitaria de las moléculas de Dbait conjugadas puede ser de 0,1 a 100 mg, preferentemente de 4 a 40 mg. En consecuencia, para una ruta sistémica, la cantidad eficiente o dosificación unitaria de las moléculas de Dbait conjugadas puede ser de 0,06 a 0,6 mg/kg de paciente. Por supuesto, la dosificación y el régimen pueden adaptarse por un experto en la materia en consideración del régimen de quimioterapia y/o radioterapia.

Para radioterapia, cualquier régimen de radioterapia conocido en la materia puede usarse, en particular irradiación estereotáctica (por ejemplo, 15 Gy) o una irradiación fraccionada. El uso de una irradiación fraccionada puede ser particularmente eficiente, por ejemplo puede aplicarse irradiación cada día o cada 2-5 días, preferentemente cada 3-4 días, en un período de uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis semanas. La irradiación puede ser de 1 a 10 Gy, preferentemente de 2 a 5 Gy, en particular 2, 3, 4 o 5 Gy. Por ejemplo, puede contemplarse la irradiación fraccionada de 15x2Gy en seis semanas, o de 4 a 6x5Gy en dos semanas. En un aspecto preferido, la radioterapia contemplada es un protocolo con 4 irradiaciones de 5 Gy en dos semanas. Diferentes regímenes o condiciones de los tratamientos combinados de cáncer con irradiación y las moléculas de Dbait se han probado y permitieron demostrar que la sensibilización a radio de los tumores por las moléculas de Dbait depende de las dosis de las moléculas de Dbait pero no de las dosis de irradiación.

Para quimioterapia, la dosificación eficaz del agente antitumoral que daña el ADN empleado en la preparación combinada, estuche o producto de la invención o en combinación con la composición de la invención puede variar en dependencia del agente antitumoral particular que daña el ADN empleado, el modo de administración, la afección que se trata, la gravedad de la afección que se trata. Por lo tanto, el régimen de dosificación del agente antitumoral que daña el ADN se selecciona de acuerdo con una variedad de factores que incluyen la ruta de administración y el estado del paciente. Un médico, clínico o veterinario con experiencia puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz del agente antitumoral que daña el ADN necesaria para evitar, contrarrestar o detener el progreso del cáncer.

El tratamiento puede incluir uno o varios ciclos, por ejemplo dos a diez ciclos, en particular dos, tres, cuatro o cinco ciclos. Los ciclos pueden ser continuos o separados. Por ejemplo, cada ciclo se separa durante un periodo de tiempo de una a ocho semanas, preferentemente tres a cuatro semanas.

Ejemplos

Una comparación multiescala de distribución y actividad de ADN corto (Dbait) que se acompleja con polietilenimina (PEI) o se enlaza a colesterol.

Caracterización de los complejos Dbait/vector y absorción celular

Se ha demostrado que PEI es capaz de formar complejos interpolielectrolitos no covalentes con ADN, oligonucleótidos y ARN. Las cadenas largas de PEI son altamente eficaces en la transfección génica, pero más citotóxicas. Los inventores probaron varias partículas de PEI poliplexas con Dbait y compararon su actividad con una Dbait modificada unida covalentemente a colesterol (denominada coDbait). La coDbait fue una molécula de Dbait unida covalentemente a una cadena grasa de colesterol que se usó sin vector adicional. Para cada vector probado, la meta principal de los inventores fue desarrollar una formulación con la distribución más homogénea de tamaño de partícula a la concentración de Dbait más alta. El diámetro y la carga superficial de las partículas se midieron mediante dispersión de la luz láser dinámica (DLS). Mediante el uso de un análisis multimodal, los inventores encontraron que el PEI ramificado (bPEI25K) con un tamaño medio de 25 Kd y el PEI lineal con tamaño de 22 Kd (PEI22K) o 11 Kd (PEI11K) formó complejos con Dbait con propiedades similares (Tabla 1).

Tabla 1. Fluorescencia y absorción celular de Dbait formulada

Moléculas/Métodos	Cloroquina (100 mg/mL)	Dbait (µg/mL)	fluorescencia ^a x10 ⁶ /µg/mL	MCC ^b 5 h	cor MCC ^c 5 h	MCC ^b 24 h	cor MCC ^c 4 h
-	-		0	2,78	ND	3,2	ND
cloroquina	+		0	3,12			
Electroporación	-	1.6	6,17	8,72	1,41	10,79	1,75
Electroporación	+	16	6,17	8,6	1,39	ND	ND
Dbait	-	1.6	6	2,65	0,43	3,45	0,56
Dbait/PEI11K	-	1.6	1,92	26,46	13,78	13,26	6,91

Moléculas/Métodos	Cloroquina (100 mg/mL)	Dbait ($\mu\text{g/mL}$)	fluorescencia ^a x1 0e-6/ $\mu\text{g/mL}$	MCC ^b 5 h	cor MCC ^c 5 h	MCC ^b 24 h	cor MCC ^c 4 h
Dbait/bPEI25K	-	1.6	3,04	51,62	16,98	57,98	19,07
Dbait/PEI22K	-	1.6	3,32	54,49	16,41	42,74	12,87
Dbait/superfect	-	1.6	6,41	220	34,32	203,78	31,79
Dbait/superfect + CQ	+	1.6	6,41	218	34,01	ND	ND
coDbait	-	1.6	3,47	10,02	2,89	ND	ND
coDbait + CQ	+	1.6	3,47	20,71	5,97	ND	ND
coDbait	-	16	3,47	65,74	18,95	64	18,44
coDbait + CQ	+	16	3,47	236,43	68,14	214,3	61,76
coDbait	-	32	3,47	145	41,79	ND	ND
coDbait + CQ	+	32	3,47	390,38	112,50	ND	ND

^afluorescencia en valor FL2 ; ^bMCC= valor FL2 medio de contenido celular (>3 experimentos) ; ^ccor MCC= FL2/fluorescencia corregido de contenido celular

Se probaron diferentes relaciones de PEI en Dbait. La relación más baja que conduce al 100 % de complejo Dbait se determinó mediante ensayo de cambio de gel. La relación N/P de 6, 6 y 9 se eligieron respectivamente para PEI11K, PEI22K y bPEI25K para estudios adicionales. Las partículas de complejo Dbait-PEI fueron estables por un periodo de una hora en sacarosa al 10 %. La morfología altamente homogénea de partículas esféricas en la población (con un tamaño en el intervalo de 125 a 140 nm) se confirmó mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 1A). La presencia de sal en el amortiguador de dilución con una concentración superior a 0,8 mg/mL, o almacenamiento prolongado, indujo la agregación de complejos de PEI. Los complejos de superfect (60 μg de Superfect/ μg de Dbait) que rinden agregados más grandes y polidispersos (>2 μm) se usaron como un control positivo. El copolímero anfifílico no cargado Lutrol no formó un complejo de interacción estable con Dbait y se usó como control negativo en algunos experimentos.

Los inventores monitorizaron la absorción celular de los diferentes complejos mediante el uso de una Dbait modificada con cy3 fluorescente. La fluorescencia inicial del complejo cy3-Dbait se monitorizó inmediatamente antes de la transfección. En los complejos de PEI, la fluorescencia de Dbait disminuyó de 2 a 3 veces, lo que indica que la compactación de las moléculas con PEI podría apagar la fluorescencia (Tabla 1). coDbait también fue menos fluorescente que Dbait desnuda, lo que indica que el colesterol podría interactuar con la cianina en la misma molécula. Superfect o Lutrol no afectan la fluorescencia. El contenido celular de células de fibroblastos transfectadas humanas se midió mediante análisis de citometría de flujo. La distribución de la fluorescencia de las células tratadas con la mezcla desnuda de Dbait o Dbait-Lutrol no fue diferente del control no tratado lo que indica que las moléculas de Dbait no entran espontáneamente en las células. La electroporación fue relativamente ineficiente y el aumento de la concentración de Dbait no mejora la eficacia de la transfección. Todos los polímeros policatiónicos (PEI y superfect) promovieron una absorción celular eficiente, pero los PEI lineales mostraron una distribución más amplia que los complejos Dbait/superfect o Dbait/PEIb25K. coDbait entró a las células sin la ayuda de factores de transfección pero con una eficacia 10 veces menor que Dbait/PEI. El aumento de 10-15 veces de la concentración de coDbait permitió la transfección eficiente (Figura 1B).

Una limitación de la eficiencia de la transferencia de ADN es su retención en los endosomas que evita que interactúe con su objetivo o que se transcriba. En la célula, el ADN debe escapar de las vías endosomales normales, que conducen a la degradación. Por lo tanto, la eficacia del suministro de ADN se correlaciona no solo con la absorción celular, sino también con la desestabilización y el escape de los endosomas. Se conoce que PEI tiene una alta capacidad de amortiguación que facilita la liberación de ADN de los endosomas y los lisosomas ("hipótesis de la esponja de protones"). Por el contrario, coDbait necesitará la ayuda de agentes fusogénicos tales como la Cloroquina (CQ), para liberarse de manera eficiente de los endosomas. A fin de mejorar la eficacia de la transfección, se añadió CQ a 100 μM a las células media hora antes de la transfección. CQ aumentó en 2-4 veces la absorción celular de coDbait (Figura 1). La cantidad de Dbait liberada en la célula se monitoreó mediante la activación de la ADN-PKcs cinasa desencadenada por su unión a las moléculas de Dbait (Quanz y otros, 2009, *más arriba*). La adición de colesterol no afectó la capacidad de Dbait para activar ADN-PK purificada (Figura 2A). En la célula, la activación de la ADN-PKcs cinasa se monitoreó mediante la cantidad de fosforilación de H2AX que se ha demostrado que es estrictamente dependiente de ADN-PK. Tanto Dbait/PEI como coDbait indujeron la fosforilación de H2AX en las células tratadas (Figura 2B). Los complejos de PEI/Dbait ramificados y lineales promovieron rápidamente la fosforilación de H2AX (Figura 2C) que alcanzó un máximo de 6 horas después del comienzo de la transfección y persistió 24 h después de la transfección. La actividad cinasa inducida por Dbait fue baja después de la electroporación en cualquier momento (Figura 2). Las altas concentraciones de CoDbait fueron muy ineficaces para fosforilar H2AX, y se

necesitaron al menos 24 horas para alcanzar el valor máximo. La adición de CQ durante la transfección aumentó la activación de ADN-PKcs en células transfectadas con CoDbait hasta la observada con 10 veces menos Dbait/PEI (Figura 2C). CQ no aumentó la actividad en las células transfectadas con Dbait/PEI lo que indica que Dbait se libera de manera eficaz de los endosomas cuando se acompleja con PEI. Como la absorción celular de CoDbait no aumentó entre 5 horas y 24 horas después de la transfección, la activación lenta de ADN-PK por coDbait revela su liberación lenta de los endosomas.

Absorción celular y toxicidad general en embriones tempranos de pez cebra

El análisis de la absorción y la actividad de Dbait en cultivos celulares no permiten concluir sobre la difusión del fármaco, la absorción celular y la actividad en el organismo completo. Los inventores evaluaron este problema mediante la inyección de Dbait-cy3, ya sea desnuda o con adyuvante, en el espacio intercelular de embriones de pez cebra en etapa celular 1000 (etapa 1K) (Kimmel y otros, 1995, Dev Dyn 203:253-310). Este protocolo permitió la observación *in vivo* mediante microscopía confocal de la distribución de Dbait-cy3 a nivel celular y subcelular así como también su actividad en las células de división rápida del embrión de pez cebra temprano. La Dbait-cy3 desnuda inyectada en el polo animal de los embriones en etapa 1K se difundió rápidamente a lo largo de todo el blastodermo y ya no se detectó más a los 15 minutos después de la inyección. La adición de Lutrol permitió retener Dbait en el espacio extracelular alrededor del punto de inyección pero no facilitó la absorción celular. En presencia de Superfect o PEI, se observaron numerosos parches fluorescentes dentro de las células que indican una absorción celular eficiente. coDbait cy3 mostró otro tipo de comportamiento con una fuerte y persistente tinción de las membranas plasmáticas junto con la fluorescencia intracelular en parche. La incubación de embriones con CQ antes de la inyección con CQ convirtió los parches fluorescentes grandes de coDbait en una distribución intracelular difusa.

La observación de los efectos fenotípicos 20 horas después de la inyección permitió evaluar la actividad de Dbait y la toxicidad general del tratamiento. La fluorescencia de Dbait se detectó 24 horas después de la inyección en las células de la cabeza de las larvas (Figura 3A-C), que de acuerdo con el desarrollo del mapa de destino del pez cebra (Woo y otros, 1995, Curr Opin Genet Dev 5: 439-443) se deriva del área inyectada en el polo animal de los embriones de pregastrulación. La inyección de Dbait sin adyuvante (NA) o combinada con Lutrol (Lu) no mostró ningún efecto sobre el desarrollo (Figura 3D) que se correlaciona con la escasa absorción intracelular de Dbait descrita anteriormente. La adición de adyuvante condujo a la muerte celular en la cabeza y en correlación con el volumen inyectado, puede observarse la muerte celular extensa y la teratogénesis. Los fenotipos de 24 horas se categorizaron como se describe (Figura 3), lo que permitió cuantificar la toxicidad de la mezcla inyectada. Para la misma concentración de Dbait, aparecieron diferencias claras en términos de muerte celular y anomalías de desarrollo posteriores, en dependencia del adyuvante. La adición de Superfect (sup) fue muy tóxica para las células embrionarias y la muerte celular extensa en etapas tempranas dio como resultado un alto porcentaje de fenotipos de tipo 2. De manera similar, la adición de PEI (25K, 22K, 11K) demostró ser tóxica para blastómeros de pez cebra. Aunque menos eficiente que la adición de PEI, la inyección de coDbait dio como resultado una muerte celular significativa. La preincubación de embriones con CQ no aumentó significativamente la toxicidad. En conjunto, la muerte temprana de las células embrionarias y las anomalías posteriores del desarrollo fue un protocolo rápido y confiable para evaluar la toxicidad general de Dbait +/- adyuvante en los embriones de pez cebra. La correlación de la muerte celular con la absorción celular sugirió que la actividad antitumoral de Dbait en células embrionarias podría jugar un papel importante en el efecto tóxico.

Toxicidad local y sistémica en ratones

Para evaluar la consistencia del cultivo celular, los embriones de pez cebra y los datos de ratón, los inventores analizaron la tolerancia de la piel de ratones desnudos a la administración repetida de Dbait/PEI1K, Dbait/PEI22K, Dbait/bPEI25K y coDbait. La toxicidad de las diferentes Dbait formuladas se analizó después de 3 inyecciones subcutáneas diarias (SC). Todos los Dbait/PEI mostraron alta toxicidad con inyecciones que se toleraron a 3,75 mg/kg pero comenzaron a 5 mg/kg para desencadenar la inflamación local asociada con necrosis local e isquemia que desapareció rápidamente con la detención del tratamiento. La toxicidad con inyección intravenosa (IV) arrojó resultados similares: las inyecciones intravenosas de Dbait/PEI fueron letales a 3 mg/kg y la muerte se produjo durante la inyección probablemente por obstrucción sanguínea. Las inyecciones lentas mediante perfusión (0,4 µL/mn) aumentaron la tolerancia hasta 6 mg/kg de Dbait/PEI (6 nmoles/inyección) lo que confirma que la mayor parte de la toxicidad IV se debe a la concentración local en el sitio de inyección del bolo. coDbait con o sin CQ no mostró ninguna toxicidad en todas las dosis probadas (hasta 800 mg/kg/inyección; 800 nmoles/inyección) cualquiera que sea la ruta usada: SC, bolo IV o perfusión IV.

Actividad antitumoral en tumores xenoinjertados

El efecto antitumoral de Dbait formulado se probó junto con radioterapia en el melanoma humano xenoinjertado SK28. Los complejos Dbait/vector se administraron 5 horas antes de cada irradiación mediante el uso de inyecciones intratumorales.

Aunque la administración de fármacos mediante inyección intratumoral (IT) se ha usado en muchos ensayos, actualmente se recomienda evitar esa vía de administración en ensayos clínicos. Los inventores investigaron cómo se podía administrar Dbait/PEI11k o coDbait mediante inyección subcutánea (SC) en el área próxima al tumor. Varios

ensayos clínicos han usado con éxito esta vía de administración. Los inventores primero compararon la difusión de las moléculas en tumores tratados con una inyección intratumoral o dos inyecciones subcutáneas realizadas en los lados opuestos del tumor (Figura 4). La Dbait fluorescente que se acompañó con PEI11k tendió a formar agregados en el sitio de inyección y se difundió progresivamente hasta el borde del tumor. Por el contrario, coDbait mostró una distribución más uniforme alrededor de la inyección ya sea dentro del tumor o en su proximidad. Las inyecciones SC de Dbait/PEI11k o coDbait fueron ligeramente menos eficientes que las inyecciones de IT en términos de control del crecimiento tumoral (Tabla 2). Sin embargo, el aumento del número de sitios de inyección debería permitir mejorar significativamente el control del crecimiento tumoral sin agregar toxicidad local.

Tabla 2. Supervivencia de ratones xenoinjertados después de la irradiación asociada a diversos tratamientos

complejos Dbait/Vector	concentración de Dbait	modo de admin. ^a	núm. de ratones	Ratones curados ^b	Tiempo de supervivencia media	Riesgo relativo (valor p)	Media de TGD	SD de TGD	% medio de TGD ^c
Mock	-	IT	79	2	72	-	11	15	160
Dbait	6 x 60 µg (3 nmol)	IT	6	0	63	1,40 (p<0,41)	3	8	114
Dbait/PEI11k	6 x 60 µg (3 nmol)	IT	38	3	123	0,26 (p<2.69.10-8)	>40	27	313
Dbait/PEI22k	6 x 60 µg (3 nmol)	IT	10	2	>150	0,09 (p<4.62.10-6)	>63	40	436
Dbait/PEIb25k	6 x 60 µg (3 nmol)	IT	19	4	>150	0,13 (p<3.73.10-8)	>60	35	419
Dbait/Lutrol	6 x 60 µg (3 nmol)	IT	10	0	72	1,2 (p<0,56)	5	5	128
Dbait/PEI11k	6 x 150 µg (7,5 nmol)	SC	12	0	135	0,34 (p<1.05.10-3)	22	15	216
CQ	-	IT	6	0	68	-	8	6	142
coDbait+CQ	6 x 600 µg (30 nmol)	IT	13	0	98	0,23 (p<4.02.10-4)	42	25	323
coDbait+CQ	6 x 1,2 mg (60 nmol)	SC	16	0	101	0,22 (p<1.05.10-3)	>22	23	218

^a modo de administración: IT, intratumoral; SC, subcutáneo
^b los ratones curados son animales sin recurrencia dentro de los 300 días posteriores al tratamiento
^c el cálculo de TGD y el análisis estadístico se describen en Materiales y Métodos

Se ha estudiado la supervivencia de cinco grupos de ratones desnudos portadores del xenoinjerto de melanoma SK28. Grupo 1) ratones no tratados (n=16); Grupo 2) ratones irradiados (IR, n=12); Grupo 3) ratones irradiados con 1 mg de

cloroquina inyectada por vía intraperitoneal (CQ, IR, n=10); Grupo 4) ratones tratados con 0,6 mg de DT01 inyectado intratumoralmente (también denominado coDbait) y se irradiaron 5 horas más tarde (DT01, IR, n=11); y Grupo 5) ratones pretratados con 1 mg de cloroquina inyectada por vía intraperitoneal 2 horas antes de la inyección intratumoral de 0,6 mg de DT01 (también denominado voDbait) y se irradiaron 5 horas más tarde (DT01, CQ, IR, n=13).

Los resultados se presentan en la Figura 5.

Con 0,6 mg de coDbait administrada intratumoralmente, el pretratamiento con cloroquina radiosensibilizó e incrementó notablemente la supervivencia (grupo 5) en comparación con la radioterapia sola (grupo 2), mientras que ni coDbait (grupo 4) ni CQ (grupo 3) mostraron radiosensibilización significativa. La extensión de la radiosensibilización del grupo 5 fue similar a la tratada con 0,06 mg de Dbait formulada con polietilimina (PEI) en la relación N/P=6.

También se ha evaluado un régimen de administración basado en una inyección subcutánea de coDbait en ratones desnudos que portan el xenoinjerto de melanoma SK28. Este régimen se describe esquemáticamente en la Figura 6. En resumen, este régimen incluye cuatro tratamientos combinados con coDbait e irradiación en dos semanas. En particular, se inyectaron 4 mg de coDbait por vía subcutánea en dos puntos opuestos separados por 5 mm del borde del tumor. Además, los animales se pretrataron con 1 mg de cloroquina (CQ) y se trataron adicionalmente con CQ a la misma dosificación durante el tratamiento con coDbait e irradiación. El crecimiento tumoral se evaluó después de este régimen de administración y los resultados se muestran en la Figura 6.

Se ha observado que el crecimiento tumoral más bajo se observa con el cotratamiento de coDbait y la irradiación con cloroquina después de un pretratamiento con cloroquina. Además, el grupo cotratado con cloroquina mostró resultados más homogéneos que aquellos sin tratamiento con cloroquina.

Conclusión

En el presente estudio, los inventores usaron un conjunto de ensayos para guiar el desarrollo de protocolos de administración y formulación de fármacos. Estos ensayos permitieron comparar diferentes formulaciones de Dbait antes de realizar ensayos preclínicos en ratones. Se usaron ensayos de embriones celulares y de pez cebra para evaluar la eficiencia de la absorción celular de Dbait, una etapa previa en el efecto antitumoral del fármaco y para seleccionar los protocolos y formulaciones más apropiados para estudios preclínicos en mamíferos. La toxicidad general en el embrión de pez cebra no se correlacionó con la toxicidad en la piel de los ratones o después de la inyección sistémica. En particular, la alta toxicidad de coDbait en el embrión de pez cebra indicó que la mayoría de las células que tuvieron contacto con el fármaco probablemente murieron mientras que la piel de los ratones no mostró ninguna reacción a las inyecciones de altas dosis de coDbait. Esta diferencia sugiere que la toxicidad en el embrión temprano del pez cebra es un indicador de la sensibilidad en tumor en lugar de la sensibilidad en tejido sano. En realidad, las moléculas de Dbait han demostrado ser específicamente tóxicas en tumores pero no en la piel normal (Quanz y otros, 2009, *más arriba*). Dbait/PEI (5 μ M) y coDbait (50 μ M) + CQ que desencadenaron la activación de ADN-PKcs comparable en cultivo celular tuvieron un efecto tóxico similar en embriones de pez cebra (Figura 3D) y mostraron actividad antitumoral significativa en tumores de ratón (Tabla 2, Figuras 5 y 6). Esta observación es consistente con la sensibilidad a la actividad antitumoral de las células embrionarias de pez cebra que comparten propiedades características con células tumorales que incluyen el índice mitótico y los rasgos bioquímicos y fenotípicos. De acuerdo con esta hipótesis, los inventores demostraron recientemente la actividad antiproliferativa de Dbait mediante inyección intracelular directa de Dbait desnuda en blastómeros de pez cebra entre la etapa de 1 y 16 células.

Los polímeros de PEI fueron, entre todas las moléculas adyuvantes probadas, los más eficientes en la formación de complejos de Dbait. Sin embargo, su uso estuvo limitado por su toxicidad en los tejidos así como también en el sistema sanguíneo. La toxicidad local fue parcialmente superada por la administración lenta (perfusión) y por la división de las dosis inyectadas en diferentes sitios de inyección. Pero la combinación covalente de colesterol y Dbait proporcionó la mejor alternativa para el suministro de Dbait a las células sin adición de adyuvante. De hecho, la falta de toxicidad dentro del intervalo de dosis probadas sugiere que esta molécula podría demostrar ser útil a pesar de las dosis más altas requeridas para el efecto antitumoral. Las dosis de 3 nmoles y 30 nmoles por inyección de Dbait/PEI11K y coDbait respectivamente duplicaron el retraso en el crecimiento tumoral inducido por la irradiación sola. La toxicidad respectiva de ambas formulaciones (6 nmoles y >800 nmoles) proporcionó una relación relativa de dosis de eficacia/ dosis de toxicidad de 0,5 para Dbait/PEI11K y < 0,037 para coDbait lo que indica que coDbait es un muy buen candidato para ensayo clínico.

Materiales y Métodos

Formación de Dbait y de Partículas

Las moléculas de Dbait y coDbait se obtuvieron mediante síntesis de oligonucleótidos en fase sólida automatizada de Eurogentec (Seraing, Bélgica) o de la División de Soluciones de Ácidos Nucleicos de Agilent Technologies (Boulder, Estados Unidos) como se describió previamente (Quanz y otros, 2009, *más arriba*). Se purificaron mediante HPLC de fase inversa y/o HPLC-IEX con desnaturalización. Algunos derivados de Dbait se marcaron con los fluoróforos Cy3 ($\lambda_{excitación}$ = 540 nm; $\lambda_{emisión}$ = 560 nm) o Cy5.5 ($\lambda_{excitación}$ = X nm; $\lambda_{emisión}$ = X nm). Los PEI lineales (11 kDa y 22 kDa) fueron

de Polyplus-Transfection (Illkirch, Francia) y se proporcionaron como una solución lista para el uso de 300 mM de concentración de nitrógeno. Branched bPEI25kd se compró a SIGMA-Aldrich (Saint Quentin, Francia). Lutrol se compró a In Cell Art (Nantes, Francia). Las soluciones de Dbait y PEI (PEI de reserva) se diluyeron en sacarosa al 10 % o NaCl 150 mM (para experimentos de transfección in vitro) para obtener diversas relaciones de vector/Dbait. La relación de PEI/Dbait (o relación N/P) se determinó de acuerdo con el número de nitrógeno de amina para PEI y fosfato para Dbait. Típicamente, para 300 μ L de complejos a 0,6 mg/mL y N/P 6, Dbait (180 μ g, 0,54 μ mol de fosfato) y la cantidad deseada de solución de polímero (11,4 μ L de solución de reserva de PEI contiene 0,3 μ mol de nitrógeno de amina) se diluyeron cada uno en 150 μ L (sacarosa al 10 %). Las partículas de Superfect/Dbait se prepararon de acuerdo con el fabricante (Qiagen, Courtaboeuf, Francia) en una proporción de 10 μ L de Superfect por μ g de ADN. La formación de complejos de vector/Dbait se analizó mediante el método de electroforesis en gel de agarosa. Las muestras (18 μ L) se mezclaron con colorante azul de bromofenol (1 μ L) y luego se cargaron en gel de agarosa al 1,5 % en la cámara de electroforesis que contenía amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, pH 8,3, EDTA 1 mM). El gel se corrió a 100 voltios durante 30 minutos. Después el gel se tiñó con bromuro de etidio (EtBr) durante 15 minutos y las bandas se observaron en luz UV.

Cultivo celular, moléculas de Dbait y transfección

Las moléculas de Dbait se elaboraron mediante síntesis de oligonucleótidos en fase sólida automatizada. La secuencia es 5'-GCTGTGCCCAACCCAGCAAACAAGCCTAGA-(H)-TCTAGGCTTG TTTGCTGGGTTGTGGGCACAGC (sec. con núm. de ident. 4) donde H es un enlazador de hexaetilenglicol. Los estudios en células en cultivo se realizaron mediante el uso de fibroblastos MRC-5 transformados con SV40. Las células se cultivaron a 37 °C en cultivos monocapa en DMEM completo (Gibco, Cergy Pontoise, Francia) con FCS al 10 % y antibióticos (100 μ g/ml de estreptomycin y penicilina 100 μ g/mL) en condiciones de 100 % de humedad, 95 % de aire y 5 % de CO₂. A menos que se especifique de cualquier otra manera, las transfecciones se realizaron en 1,2 mL de medio MEM sin suero en placas de 60 mm de diámetro. La transfección con jetPEI (Polyplus-transfection, Illkirch, Francia) se realizó a una relación N/P de 6 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, Dbait se diluyó en NaCl 150 mM y se mezcló suavemente con un volumen igual de PEI en NaCl 150 mM y se añadió al medio DMEM sin suero. coDbait se añadió directamente al medio DMEM sin suero. La transfección de las moléculas de Dbait se realizó con reactivo Superfect en 1,2 mL de medio DMEM con suero (en placas de 60 mm de diámetro) durante 5 horas y después las células se dejaron recuperar durante 1 hora si no se indica de cualquier otra manera. Para la electroporación, se transfectaron 1,2x10⁶ células con 2 μ g de Dbait mediante el uso del Gene Pulser II (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francia). Al final de la transfección de 5 h (tiempo cero), el medio se reemplazó por medio completo y las células se cultivaron el tiempo indicado antes para su análisis. La cloroquina (50 μ M) se añadió 30 min antes de la transfección.

Citometría de flujo

Las células se transfectaron con diferentes complejos con Dbait-cy3 durante 5 h y se dejaron crecer 5 horas o 24 horas, se lavaron rápidamente con PBS. Las células se analizaron directamente mediante citometría de flujo. Para la detección de inmunofluorescencia mediante citometría de flujo, las células se fijaron en paraformaldehído al 2 % durante 10 minutos antes de la inmunodetección. Nótese que el tratamiento de permeabilización eliminó la mayor parte de la detección de inmunofluorescencia que afecta a Dbait y la detección de Dbait en las mismas células. Las células se fijaron durante 15 min en formaldehído al 4 %, se permeabilizaron en Tritón X-100 al 0,2 % durante 1 hora, se bloquearon con BSA al 2 % y se incubaron con anticuerpo primario durante 2 horas en hielo con anticuerpos monoclonales anti- γ -H2AX (Upstate Biotechnology, Temecula, CA, Estados Unidos) Y se revelaron con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa-488 (Molecular Probes, Eugene, OR, Estados Unidos), Texas Red (Rockland, Gilbertsville, PA, Estados Unidos) a una dilución de 1/200 durante 30 min a TA. Las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en PBS con 50 μ g/mL de Yoduro de Propidio, 25 U/ml de RNasaA. Las células se analizaron mediante un citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) y los datos se analizaron mediante el uso de BD CellQuest Pro (BD Biosciences) y el programa informático gratuito WinMDI 2.8 (Instituto de Investigación Scripps, La Jolla, CA, Estados Unidos).

Cría de pez cebra, recolección y tratamiento de embriones

Los huevos de pez cebra se obtuvieron a partir del desove natural de líneas de peces (*Bactina: egfp-ras*) de tipo silvestre o transgénicas. Se usaron micromanipuladores Narishige (MN 153) fijados en un escopio de disección con iluminación de epifluorescencia (Leica MZ16F) e inyector de aire (Eppendorf FemtoJet) para realizar la inyección de Dbait en la etapa celular 1K. Los capilares de vidrio (Aparato Harvard GC100-10) se extrajeron con un extractor de pipeta vertical KopF (KopF 720) para hacer las agujas de inyección. Se inyectaron de 2 a 5 nl de solución de Dbait en el polo animal de embriones en el ciclo celular 10 y se procesaron inmediatamente para obtener imágenes microscópicas confocales de barrido con láser (Leica SP2 vertical) con objetivo de lente de inmersión en agua 40x/0,8 NA. La obtención de imágenes se realizó mediante excitación simultánea a 480 nm (eGFP) y 561 nm (cy3). Los embriones se cultivaron adicionalmente a 28,5 °C hasta 24 hpf. Se observaron larvas de un día de vida bajo el tope de disección y los fenotipos se categorizaron como se describe en la Figura 3. El tratamiento con cloroquina antes de la inyección consistió en 2 horas de incubación en medio embrionario (The Zebrafish Book) con cloroquina 50 μ M. Se inyectó Dbait (coDbait)-cy3 50 μ M sola o en combinación con PEI25K (relación N/P=9), PEI11K (relación N/P=6), Superfect (10 μ L/1 μ g de Dbait).

Dbait y tratamientos de irradiación en ratones

5 Los tumores de injerto SK28 o U87G se obtuvieron mediante la inyección de 10^6 células tumorales en el flanco de ratones hembra adultos desnudos (Charles River strain; L'arbresle, Francia). Los animales se alojaron en el laboratorio al menos una semana antes de comenzar los experimentos. Hubo 5-6 animales por jaula en condiciones controladas de ciclos de luz y oscuridad (12 h:12 h), humedad relativa (55 %) y temperatura (21 °C). La comida y el agua corriente estuvieron disponibles *ad libitum*. Después de aproximadamente 12 días, cuando los tumores subcutáneos midieron 10 150-200 mm³, los ratones se separaron en grupos homogéneos de como máximo 12 cada uno para recibir diferentes tratamientos. La irradiación se realizó en una unidad ¹³⁷Cs (0,5 Gy/min) con un escudo diseñado para proteger aproximadamente dos tercios del cuerpo del animal. Las dosis se controlaron mediante dosimetría de termoluminiscencia. Se suministró una dosis total de 30 Gy en 6 sesiones a intervalos de tres sesiones de 5 Gy por semana durante dos semanas. Las moléculas de Dbait se prepararon en 100 µL de sacarosa al 10 % como se describió anteriormente para estudios in vitro excepto que la mezcla de PEI se realizó sin NaCl (Polyplus Transfection, 15 Strasbourg, Francia). Las mezclas de Dbait se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de la inyección. CoDbait se diluyó en sacarosa al 10 % a la concentración necesaria. Las inyecciones intratumorales de la cantidad indicada de Dbait se realizaron 5 h antes de cada sesión de radioterapia. Los animales tratados con Mock se inyectaron con 100 µL de glucosa al 10 % de acuerdo con el protocolo de los ensayos asociados. El tamaño del tumor se evaluó mediante mediciones de calibre cada tres días y el tamaño se calculó mediante la fórmula (2 x longitud x ancho²). Se pesaron los ratones y se tomaron fotografías de los tumores cada semana. Por razones éticas, los animales se sacrificaron cuando sus tumores alcanzaron los 2,000 mm³. Este punto final usado en el análisis de supervivencia fue el día de la muerte. El Comité Local de Ética de la Experimentación Animal (Orsay, Francia) aprobó todos los experimentos.

25 Análisis estadístico

Se realizaron análisis descriptivos de la respuesta tumoral para cada tratamiento y cada tipo de tumor. El día 1 fue el día de la primera sesión de tratamiento. A todos los animales se les dio seguimiento durante al menos 150 días. La vida media se estimó de acuerdo con el método de Kaplan-Meier. El retraso del crecimiento tumoral (TGD) se calculó 30 mediante la sustracción del tiempo de cuadruplicación del volumen tumoral medio del grupo control del tiempo de cuadruplicación del volumen tumoral de ratones individuales en cada grupo tratado. La media de TGD se calculó para cada grupo tratado mediante el uso de las mediciones individuales. Las curvas de supervivencia general se evaluaron mediante las estimaciones de Kaplan-Meier y se compararon mediante el uso de la prueba no paramétrica LogRank ya que los datos no siguen una distribución normal. El análisis se realizó mediante el uso del programa informático 35 statEL (ad Science, París, Francia). Un LogRank general se realizó por primera vez para cada grupo con el mismo tipo de tumor. Después, los tratamientos con Dbait se compararon con el control tratado con mock. El número de animales (n), el riesgo relativo (RR) y el valor de p se informan en la Tabla 2. Todas las pruebas se consideraron significativas al nivel de significancia de 0,05.

40 Propiedades fisicoquímicas de las partículas de Dbait formuladas

El tamaño de partícula del vector/Dbait se determinó mediante la dispersión dinámica de la luz (DLS) en Zetasizer nano series, (instrumentos Malvern, París, Francia) con estas especificaciones: viscosidad media: 1,150 cP, índice de refracción: 1,45, ángulo de dispersión: 90°, temperatura: 25 °C. Los datos son el promedio de 3-5 mediciones por 45 muestra con cada medición que promedia los datos de 10-15 subcorridos. Los datos se analizaron mediante el uso del programa informático de distribución de números multimodal suministrado con el instrumento. Para la medición del potencial zeta, las partículas se diluyeron en sacarosa al 10 %/NaCl 10 mM para dar una concentración final de Dbait de 0,1 mg/mL y se midieron con las siguientes especificaciones: 3 mediciones, viscosidad media: 1,054 cP, constante dieléctrica media: 79, temperatura: 25 °C.

50

Polímeros catiónicos	Relación (p/p)	a Tamaño ^b (nm)	Zeta ^c (mV)	Pdl	[C] _{máx} (mg/mL)	suministrador
Superfect	-	>1000	-	1	nd	Qiagen
bPEI25K	2,1	175±51	+ 40	0,11	1,5	Sigma-Aldrich
PEI22K	1,4	133±25	+ 46	0,17	1.0	Polyplus Transfection
PEI11k	1,4	125±13	+ 30	< 0,2	0,8	Polyplus Transfection

^a relación de peso a la que se observa la actividad máxima de Dbait

^b Diámetro medio (+/- SD) según se determinó mediante dispersión de luz dinámica (ver Materiales y Métodos complementarios).

^c Partículas en Sacarosa al 1 %, NaCl 10mM

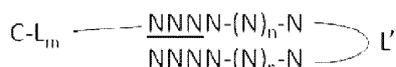
Microscopía Electrónica de Transmisión

5 Se prepararon las muestras para microscopía electrónica de transmisión mediante tinción negativa con acetato de uranilo. Se depositó una gota de muestra (10 µL) en la rejilla (formvar/carbono sobre cobre de 200 mesh, AGAR científico) y se dejó durante 3 minutos antes de eliminar el exceso de líquido con papel secante. Después los complejos se tiñeron con 10 µL de acetato de uranilo acuoso (2 %) durante 2 min y el exceso se eliminó con papel secante. Las observaciones se realizaron con un Microscopio Electrónico Jeol JEM-100S.

10 Ejemplos de Referencia: Moléculas de Dbait conjugadas alternativas

Se han preparado moléculas de Dbait conjugadas alternativas y se describen a continuación:

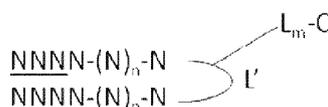
15 Moléculas conjugadas de fórmula (Ile)



con

Compuesto	C-Lm	L'	Masa medida (MALDI-TOF)
0902	Colesterol-trietilenglicol	hexaetilenglicol	20830.5
0903	1,2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina-N-[4-(p-fenil-3-((6-fosfohexilitio)-succinimido))butiramida]-	hexaetilenglicol	21306.9
0904	N-octadecil-hexilitioamida-	hexaetilenglicol	20411.6
0905	N-hexil-ácido fólico-amida-	hexaetilenglicol	20739.2

20 Ejemplos de Referencia: Moléculas conjugadas de fórmula(Ie)



25 con

Compuesto	C-Lm	L'	Masa medida (MALDI-TOF)
0813	Colesterol-trietilenglicol	N-(5-hidroximetil-6-fosfohexil)-11-(3-(6-fosfohexitio) succinimido) undecamida	21127.7
0815	Colesterol-dihexilsulfuro	1,3-bis-[5-hidroxilpentilamido]propil-2-(6-fosfohexilo)	21454.0

30 La actividad de estas moléculas de Dbait conjugadas alternativas se ha medido a través de la inhibición de la ADN-PK como se detalla anteriormente (Figura 7). Se ha observado que las moléculas conjugadas mantienen su actividad. En particular, la conjugación de varios lípidos y ligando en el extremo 5' o en el lazo tiene un efecto menor sobre la capacidad de estas moléculas para activar la actividad de ADN-PK.

35 Además, su actividad también se ha medido en líneas celulares, con o sin cloroquina, mediante la determinación de la cantidad de fosforilación de H2AX según se detalló anteriormente (Figura 8). Primero, para las moléculas de Dbait conjugadas, se ha observado que su actividad es mayor con un tratamiento previo con cloroquina. Además, puede observarse que la conjugación del colesterol al extremo 5' conduce sorprendentemente a moléculas más eficaces que la conjugación del colesterol en el lazo en horquilla (ver 0902 en comparación con 0813 y 0815).

40 Absorción celular de moléculas de Dbait conjugadas

La absorción celular de la Dbait conjugada a colesterol, en particular CoDbait, en comparación con la Dbait, se midió por los inventores mediante análisis de citometría de flujo.

Los resultados se dan en la siguiente tabla.

ES 2 674 412 T3

Cy3	intensidad de fluorescencia de Cy3 @5 h.	
	Media	Media
Condiciones de transfección		
Dbait-Cy3 79nM	3	3
Dbait-Cy3 79nM + Superfect	426	327
CoDbait-Cy3 79nM	10	10
CoDbait-Cy3 79nM + CQ 50µM	20	21
CoDbait-Cy3 986 nM	63	66
CoDbait-Cy3 986 nM + CQ 50µM	239	236
Co_siARN_H2AX-Cy3 79nM	53	56
Co_siARN_H2AX-Cy3 79nM + CQ 50µM	60	63
Co_siARN_H2AX 986nM	661	710
Co_siARN_H2AX-Cy3 986nM + CQ 50µM	1144	1214
Co_siARN que son ejemplos de referencia.		

El análisis mediante citometría de flujo de la absorción celular en la línea celular MRC5 se realizó a las 5 horas después del comienzo del tratamiento de diversas condiciones de transfección como se describe en la tabla. Todos los oligonucleótidos se etiquetaron con colorante cianina 3 (Cy3): Dbait (Dbait-Cy3), colesterol-Dbait (0813) (CoDbait-Cy3) y ARNsi que se dirige a H2AX con una cianina 3 y un colesterol en los extremos 5' y 3' de la cadena con sentido (Co_siARN_H2AX: Cy3-5'-CAACAAGAAGACGCGAAUCTT-3'-colesterol (sec. con núm. de ident. 6); 5'-GAUUCGCGUCUUCUUGUUGTT-3' (sec. con núm. de ident. 7). Cuando se indicó, se añadió 50 µM de cloroquina (CQ) antes de la transfección.

5

10

Listado de secuencias

<110> ADN Therapeutics
Instituto Curie

15

<120> Sistema de suministro in vivo optimizado con agentes endosomolíticos para conjugados de ácidos nucleicos

<130> B1050PC

20

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.3

25

<210> 1
<211> 32
<212> ADN
<213> secuencia artificial

30

<220>
<223> Dbait32

<400> 1
acgcacgggt gttgggtcgt ttgttcgat ct 32

35

<210> 2
<211> 32
<212> ADN
<213> secuencia artificial

40

<220>
<223> Dbait32Ha

<400> 2
cgtaggtcgt ttgttggtcgt ttgcagtggc ac 32

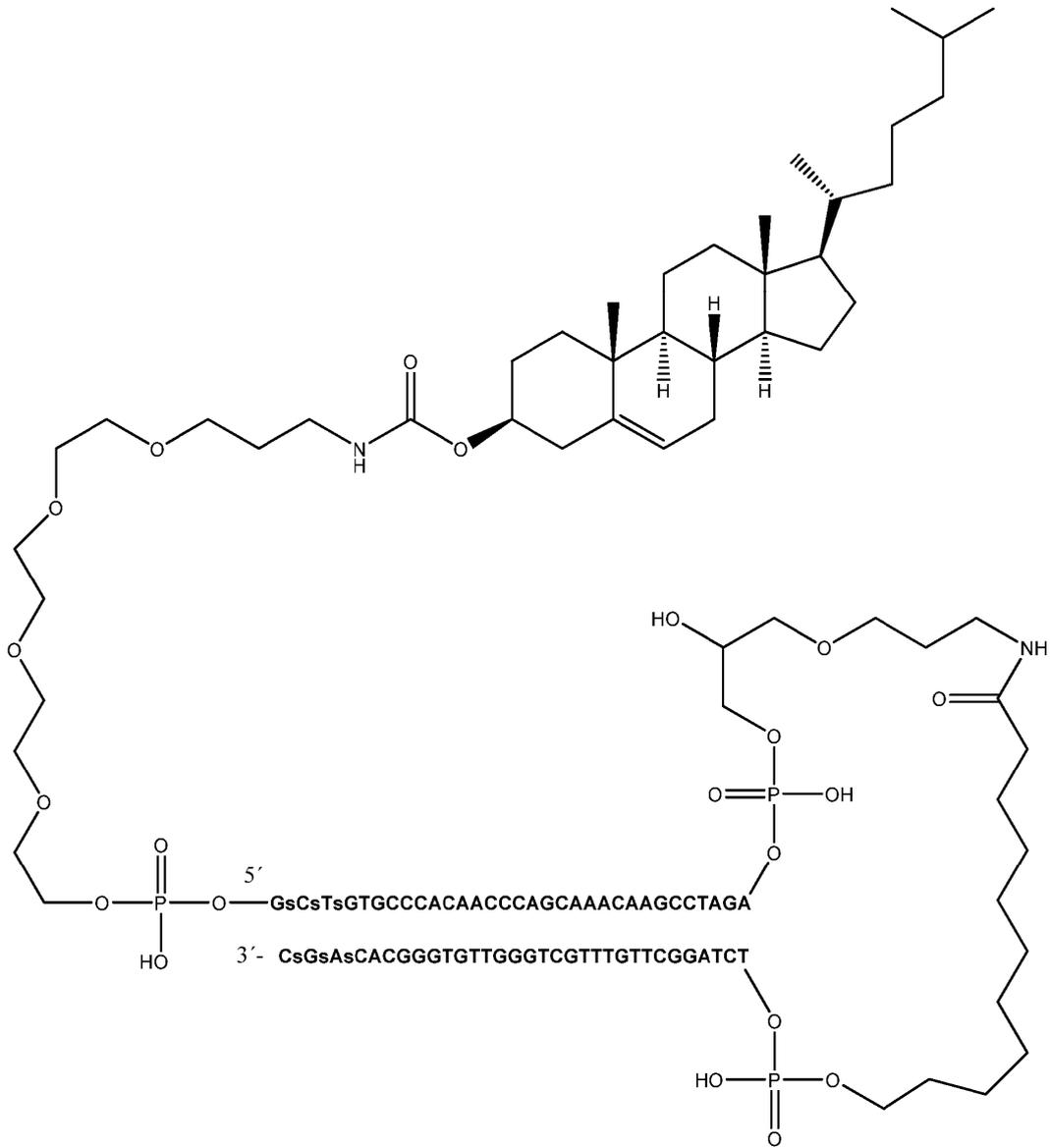
45

ES 2 674 412 T3

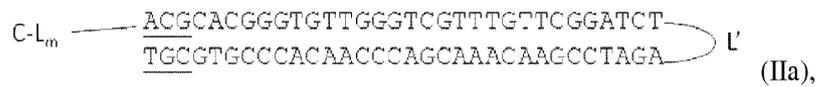
<210> 3
<211> 32
<212> ADN
<213> secuencia artificial
5
<220>
<223> Dbait32Hb
<400> 3
10 gctaggcttg ttgctgggt tgtaggcaca gc 32
<210> 4
<211> 32
<212> ADN
15 <213> secuencia artificial
<220>
<223> Dbait32Hc
20 <400> 4
gctgtgccca caaccagca aacaagccta ga 32
<210> 5
<211> 32
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> Dbait32Hd
30 <400> 5
gctaggtctg ttggtggct tgcagtggc ac 32
<210> 6
<211> 21
35 <212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
40 <223> siARN
<400> 6
caacaagaag acgcgaauct t 21
45 <210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> secuencia artificial
50 <220>
<223> siARN
<400> 7
55 gauucgcguc uucuuguugt t 21

REIVINDICACIONES

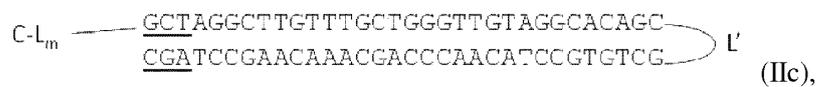
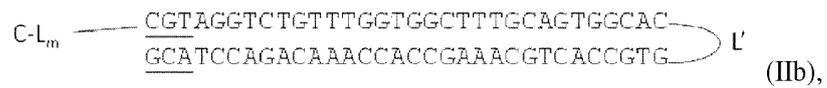
1. Una molécula de ácido nucleico conjugada de la siguiente fórmula:



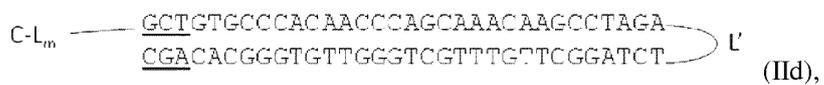
2. Una molécula de ácido nucleico conjugada que tiene una de las siguientes fórmulas:

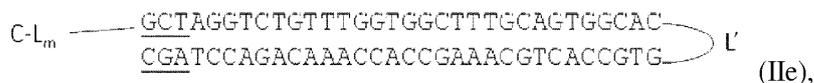


10



15





5 en donde el nucleótido subrayado se refiere a un nucleótido que tiene o no un esqueleto de fosforotioato o metilfosfonato, el L' enlazado se selecciona del grupo que consiste en hexaetilenglicol, tetradesoxitimidilato (T4) y 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano; m es 1, L es un carboxamido oligoetilenglicol y C se selecciona del grupo que consiste en dioleoil, octadecil, ácido fólico, tocoferol y colesterol.

10 3. La molécula de ácido nucleico conjugada de acuerdo con la reivindicación 2, en donde C se selecciona del grupo que consiste en tocoferol y colesterol.

4. La molécula de ácido nucleico conjugada de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la molécula es



15 y en donde el nucleótido subrayado se refiere a un nucleótido que tiene un esqueleto de fosforotioato.

20 5. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico conjugada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4.

6. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 5, en donde dicha composición comprende además un agente anti-tumoral que daña el ADN y un portador farmacéuticamente aceptable.

25 7. Un estuche que comprende una molécula de ácido nucleico conjugada de acuerdo con la reivindicación 2 o 4 y un agente anti-tumoral que daña el ADN, como una preparación combinada para el uso simultáneo, separado o secuencial.

30 8. Una molécula de ácido nucleico conjugada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4 para el uso en el tratamiento de un cáncer en un sujeto que lo necesita.

9. La molécula de ácido nucleico conjugada para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en combinación con radioterapia o quimioterapia, opcionalmente con un agente antitumoral que daña el ADN.

Figura 1A

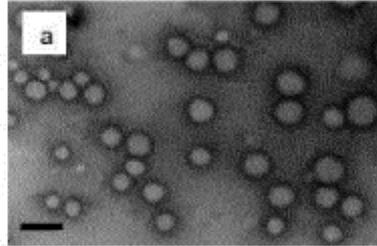


Figura 1B

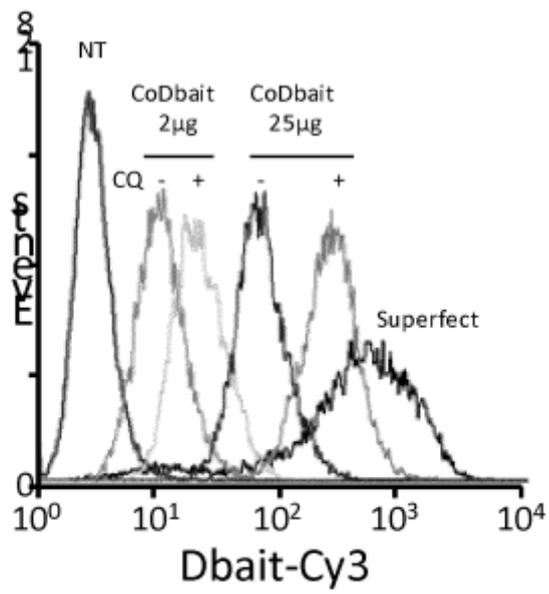


Figura 2A

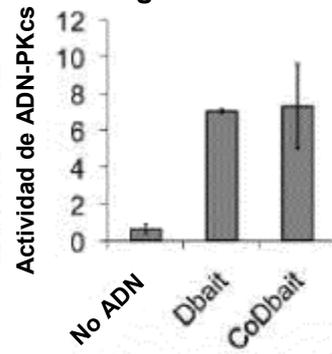


Figura 2B

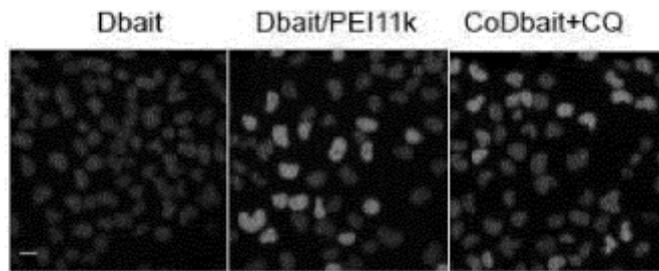


Figura 2C

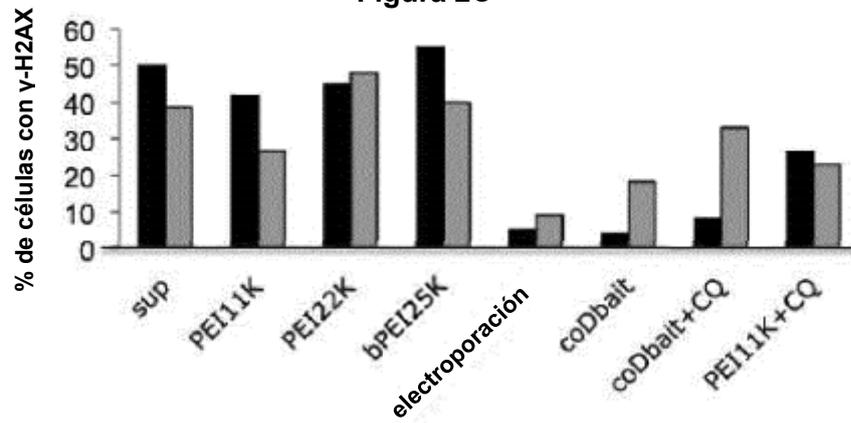


Figura 3A

Figura 3B

Figura 3C

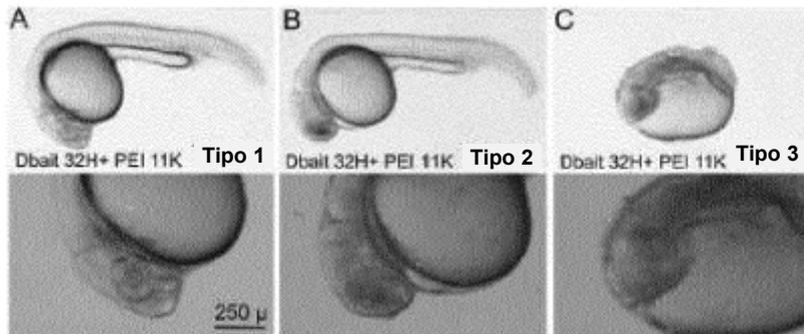


Figura 3D

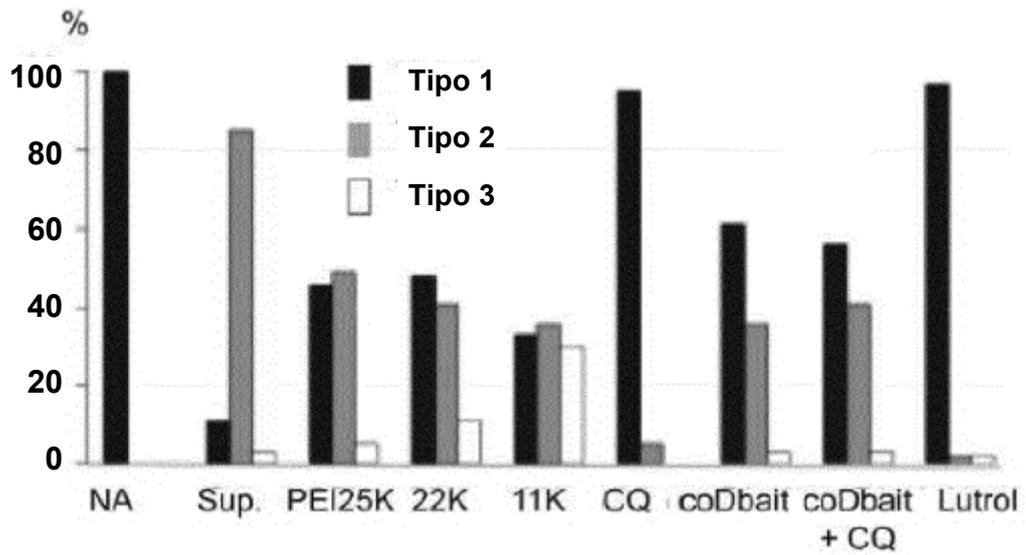


Figura 4

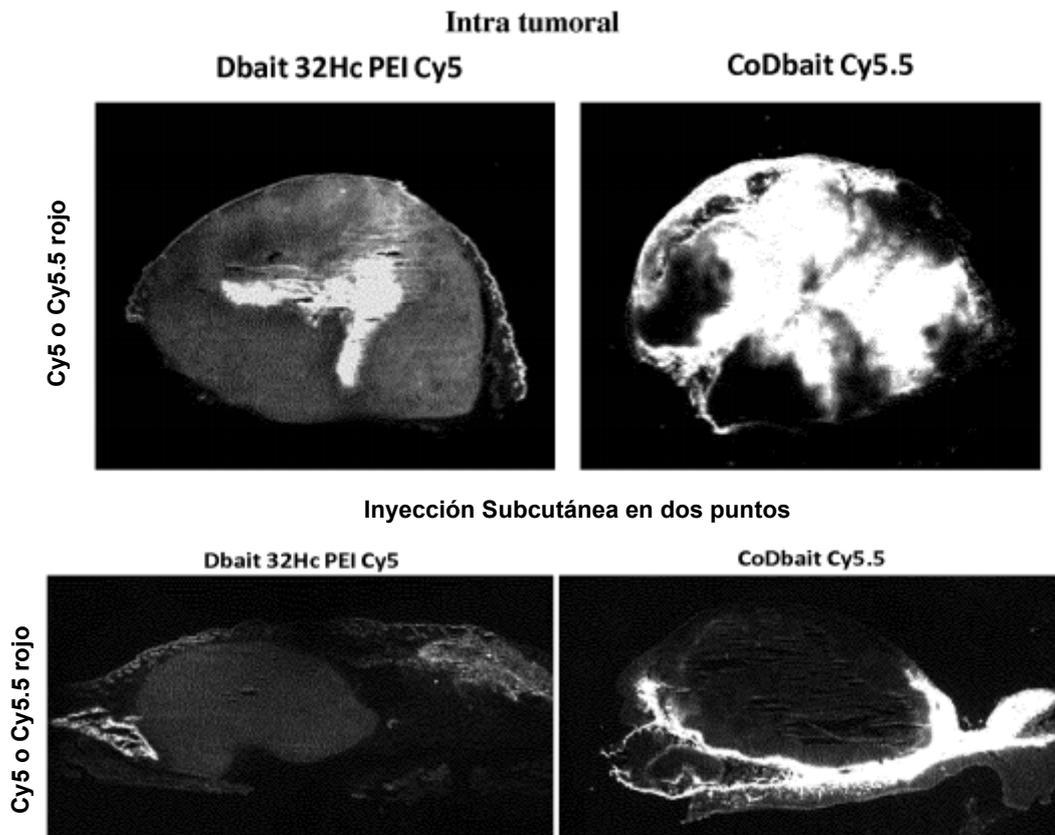


Figura 5

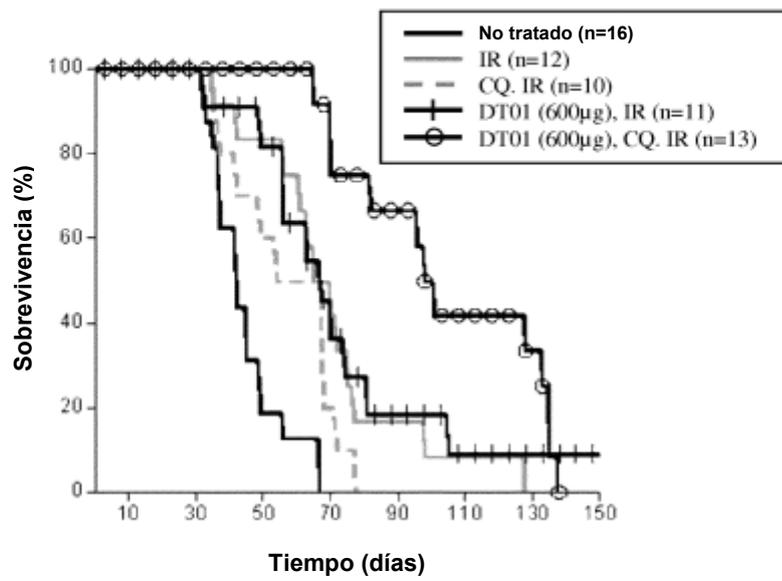


Figura 6

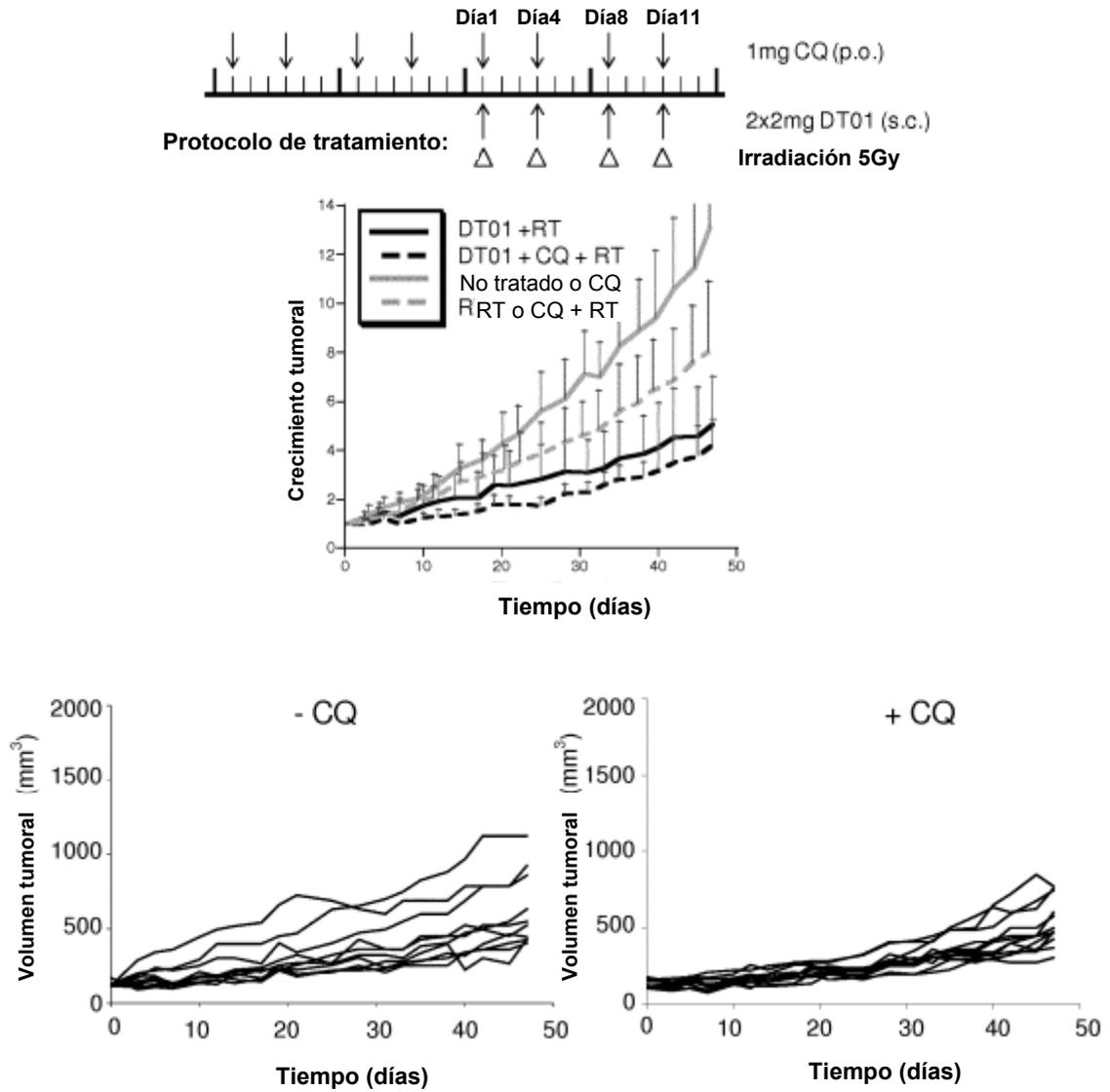


Figura 7

Fosforilación de p53 por ADN-PK

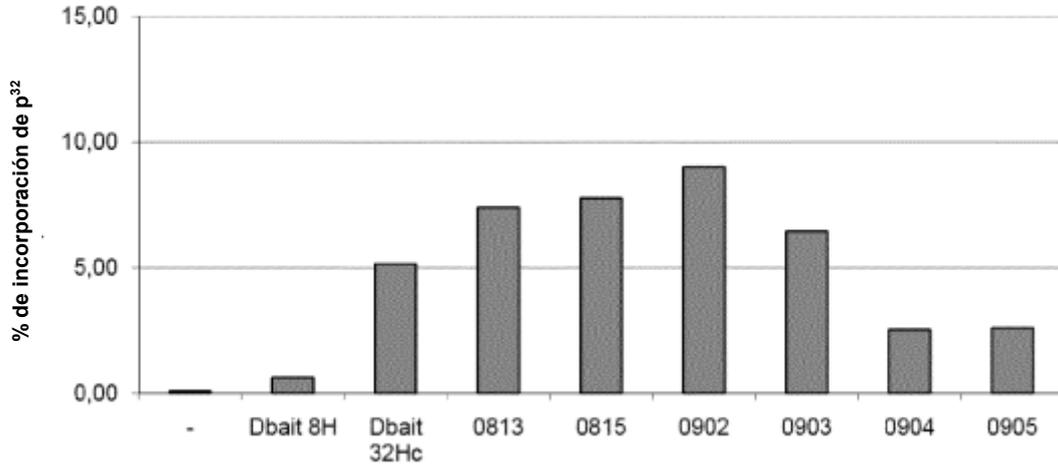


Figura 8

Actividad a las 24 h de 6,25 µg de CoDbait (0813), CoDbaitSH (0815), CoDbaitCo5' (0902), DiolDbait (0903) o MonoioIdbait (0904)

