

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 242**

21 Número de solicitud: 201700069

51 Int. Cl.:

C07K 14/575 (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)
C08G 83/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61K 47/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:
31.01.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:
31.07.2018

71 Solicitantes:
UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (100.0%)
Plaza de San Diego, S/N
28801 Alcalá de Henares (Madrid) ES

72 Inventor/es:
DE LA MATA DE LA MATA, Francisco Javier;
CARMENA SIERRA, María José;
GÓMEZ RAMÍREZ, Rafael;
SÁNCHEZ-NIEVES FERNÁNDEZ, Javier;
MUÑOZ MORENO, Laura y
SANCHEZ MILLA, María

54 Título: **Nanoconjugados formados por moléculas dendríticas y péptidos como agentes antitumorales frente al cáncer**

57 Resumen:

Nanoconjugados formados por moléculas dendríticas y péptidos como agentes antitumorales frente al cáncer

La presente invención se refiere a la formación de nanoconjugados que presentan actividad antitumoral, principalmente frente al cáncer de próstata avanzado, pero sin descartar otros. Los nanoconjugados están formados por sistemas dendríticos (dendrimeros o dendrones) y neuropéptidos. Las moléculas dendríticas son principalmente de estructura carbosilano con funciones amonio en la periferia. Los péptidos son preferentemente de la familia glucagón/secretina (ej.: VIP, GHRH, PACAP). La combinación de estos dos sistemas da lugar a un nanoconjugado con propiedades anticancerígenas, diferentes a las de sus precursores por separado. La actividad antitumoral se refleja en la inhibición de crecimiento y muerte de células tumorales de cáncer de próstata avanzado (PC3) y además estos nanoconjugados favorecen la adhesión celular y evitan procesos de migración de las células tumorales, es decir, procesos de metástasis.

ES 2 677 242 A1

DESCRIPCIÓN

**NANOCONJUGADOS FORMADOS POR MOLÉCULAS DENDRÍTICAS Y PÉPTIDOS
COMO AGENTES ANTITUMORALES FRENTE AL CÁNCER.**

- 5 La presente invención se refiere a la formación de nanoconjugados que presentan actividad antitumoral, principalmente frente al cáncer de próstata avanzado. Los nanoconjugados están compuestos de sistemas dendríticos (dendrimeros y dendrones) y neuropéptidos. Las moléculas dendríticas son principalmente de estructura carbosilano y con funciones amonio en la periferia y los péptidos son preferentemente
10 de la familia glucagón/secretina (ej.: VIP, GHRH, PACAP).

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

- El cáncer de próstata (CP) es el segundo más frecuente entre los hombres a nivel mundial (Siegel, *et al.*, Cancer J. Clin., 2014, 64, 9). Se trata de un tumor heterogéneo
15 con una lenta pero constante velocidad de crecimiento, que evoluciona desde un estadio localizado y con sensibilidad a andrógenos hasta un estadio avanzado en el que se pierde dicha sensibilidad. El tratamiento depende del estadio de la enfermedad; si se descubre de forma temprana puede ser tratado satisfactoriamente mediante diferentes procedimientos; desafortunadamente, cuando las células tumorales invaden el área de
20 la glándula, evoluciona hacia un fenotipo de metástasis y los tratamientos actuales no ofrecen posibilidades de curación. Además, este tipo de cáncer tiene tendencia a metastatizar a hueso (90%) y a pulmón (46%) (Bubendorf, *et al.*, Hum Pathol, 2000, 31, 578), las cuales son de las metástasis con menor pronóstico de curación.
- 25 Neuropéptidos como el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH), o el péptido activador de la adenilatociclasa hipofisaria (PACAP), pertenecientes a la familia del glucagón/secretina (Cardoso, *et al.*, BMC Evol. Biol., 2010, 10, 13), tienen una amplia actividad biológica en el organismo y están muy implicados en la etiopatogénesis del CP. El VIP tiene un efecto protumoral en tumores
30 de próstata, aumentando la proliferación, protegiéndolo de la apoptosis (Gutierrez-Cañas, *et al.*, Br. J. Pharmacol., 2003, 139, 1050), aumentando la angiogénesis (Collado, *et al.*, Peptides (Amsterdam, Neth.), 2007, 28, 1896), la metástasis (Fernández-Martínez, *et al.*, Prostate, 2009, 69, 774) y ayudando a la progresión del cáncer hacia estadios más agresivos (Fernández-Martínez, *et al.*, Cancer Lett., 2010,

299, 11). Su mecanismo de acción es a través de receptores tipo GPCRs: PAC₁, VPAC₁, VPAC₂ y FPRL-1 (Garcia-Fernandez, *et al.*, Peptides, 2003, 24, 893, El Zein, *et al.*, 2008, 83, 972). Por su parte, la GHRH también actúa a través de receptores GPCR, en este caso hGHRH y sus diferentes variantes de “splicing” (SVs). Su función es regular la secreción de la hormona de crecimiento (GH) (Martinez-Moreno, *et al.*, Gen. Comp. Endocrinol., 2014, 199, 38), que a su vez induce la activación del factor IGF-1 (Gan, *et al.*, Mol. Endocrinol., 2013, 27, 1969), el cual juega un papel crucial en la malignidad, metástasis y tumorigénesis en varios tumores como el CP (Bellyei, *et al.*, Cancer Lett., 2010, 293, 31, Shevah, *et al.*, Growth Horm. IGF Res., 2007, 17, 54, Takeuchi, *et al.*, Mol. Cell. Endocrinol., 2014, 384, 117).

Tanto VIP como GHRH tienen una acción autocrina y paracrina en las células cancerígenas de próstata (Gutierrez-Cañas, *et al.*, Br. J. Pharmacol., 2003, 139, 1050, Busto, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2002, 99, 11866), por lo que siempre hay una concentración basal de ambos en el interior celular y en su entorno, que “retroalimentan” a las células. Ambos se unen a sus receptores GPCRs de membrana e inician una cascada de eventos mediados por el aumento de AMPc como segundo mensajero principal, aunque también puede ser mediada por otros como Ca²⁺. Para ambos péptidos se han diseñado antagonistas muy prometedores en el tratamiento de diversos tumores humanos (Plonowski, *et al.*, Int. J. Cancer, 2002, 98, 624, Fahrenholtz, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2014, 111, 1084, Muñoz-Moreno, *et al.*, Invest. New Drugs, 2014, 32, 871). Sin embargo, los antagonistas siguen teniendo problemas, ya que aunque su tiempo de vida media es mayor que el de los péptidos originales, sigue siendo corto.

Los sistemas (o moléculas) dendríticos (dendrímeros y dendrones) son macromoléculas hiperramificadas de estructura perfectamente definida y polifuncionalizadas. Los dendrímeros son de morfología esférica con una superficie multivalente y los dendrones son de topología tipo cuña, también con una superficie multivalente y una posición activa adicional en el vértice de esta cuña denominada punto focal. Los dendrones se pueden considerar como fragmentos de dendrímeros, y de hecho, uno de los procedimientos sintéticos de dendrímeros emplea precisamente dendrones como bloque de construcción (Sánchez-Nieves, *et al.*, Tetrahedron, 2010, 9203). Además, en el caso de dendrímeros y dendrones con el mismo tipo de esqueleto, se emplean el mismo tipo de

reacciones para la síntesis de ambas topologías (Fuentes-Paniagua, *et al.*, RSC Adv., 2016, 6, 7022). Tanto dendrímeros como dendrones permiten concentrar un gran número de grupos funcionales produciendo un efecto único y diferente al que encontraríamos en estos mismos grupos si estuviesen de forma individual (Astruc, *et al.*, Chem. Rev., 2010, 110, 1857, Newkome, *et al.*, Dendrimers and Dendrons, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2004, 1).

Sistemas dendríticos se han empleado como transportadores de fármacos o de ácidos nucleicos antitumorales por su capacidad de absorberse “in vivo” en zonas tumorales e internalizar el tratamiento en las células cancerígenas debido al efecto EPR (Enhanced Permeability and Retention) (Chen, *et al.*, World J. Surg. Oncol., 2012, 10, 3, Jain, *et al.*, Eur. J. Pharm. Biopharm., 2014, 87, 500, Huang, *et al.*, Biomacromolecules, 2014, 15, 915). Este efecto se basa en que las zonas tumorales con mayor actividad angiogénica presentan una mayor cantidad de vasos sanguíneos cuyo endotelio tiene una mayor permeabilidad (las células suelen estar separadas entre 200-600 nm) que en un vaso sanguíneo “sano”, permitiendo el paso de sustancias a través de él con mayor facilidad. Además, una vez que el dendrímero sale del vaso sanguíneo se acumula en la zona tumoral, ya que el flujo del sistema linfático está reducido en estas zonas y es más difícil devolverlos al sistema circulatorio, al contrario que ocurre con las moléculas pequeñas que sí regresan al torrente sanguíneo (Azzopardi, *et al.*, J. Antimicrob. Chemother., 2013, 68, 257, Fang, *et al.*, Adv. Drug Delivery Rev., 2011, 63, 136, Konno, *et al.*, Cancer, 1984, 54, 2367).

Para actuar como transportadores de ácidos nucleicos, se emplean generalmente sistemas catiónicos, como por ejemplo moléculas dendríticas catiónicas, que mediante interacción electrostática con ellos, permiten proteger a dichos ácidos de la degradación por nucleasas (Svenson, *et al.*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2012, 64, 102). Estrategias similares se han empleado para estudios de terapias con péptidos, como por ejemplo contra el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) (Ionov, *et al.*, Biochimica et Biophysica Acta, 2015, 1848, 907). También en estos nanoconjugados la interacción electrostática entre el sistema dendrítico y péptido se emplea para estabilizar los péptidos y transportarlos hacia las células, donde su liberación facilita su actividad.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona la preparación de nanoconjugados activos frente al cáncer de próstata avanzado. Estos sistemas están formados por moléculas dendríticas (dendrímeros y dendrones) y neuropéptidos. Preferentemente, las macromoléculas dendríticas son de estructura carbosilano, principalmente con funciones catiónicas en la periferia, y los neuropéptidos son de la familia glucagón/secretina, principalmente VIP, GHRH y PACAP. Estos nanoconjugados se forman por combinación de la molécula dendrítica y el péptido correspondiente en la proporción necesaria. La formación del nanoconjugado permite crear un sistema que presenta propiedades anticancerígenas en cáncer de próstata avanzado y evitar la metástasis.

Por tanto, un primer aspecto de esta invención se refiere a una combinación de péptido y molécula dendrítica que comprende:

- Un neuropéptido, preferentemente de la familia glucagón/secretina.
Este péptido es preferentemente el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) o el péptido activador de la adenilatociclasa hipofisaria (PACAP), sin descartar otros que tengan una actividad similar.
- Un compuesto dendrítico, que se refiere en la presente invención a una macromolécula muy ramificada donde las unidades, ramas o ramificaciones de crecimiento tienen esqueleto carbosilano.

Este compuesto dendrítico es preferentemente un dendrímero, con forma esférica que presenta un núcleo de crecimiento de la molécula polifuncional. Las unidades, ramas o ramificaciones de crecimiento tienen esqueleto carbosilano y la capa externa, superficie o periferia del dendrímero incorpora grupos preferentemente catiónicos. El esqueleto y la estructura de estos dendrímeros carbosilanos con diferentes núcleos han sido descritos previamente (ver por ejemplo ES-2444490).

El compuesto dendrítico también puede ser de tipo cuña dendrítica o dendrón, que se refiere a una macromolécula muy ramificada con forma de cono y que está definida por un punto focal, las unidades, ramas o ramificaciones de crecimiento, que parten de dicho punto focal y la capa externa, superficie o periferia de dichas ramificaciones que incorpora grupos funcionales. El esqueleto y la estructura de estos dendrones

carbosilanos con diferentes puntos focales han sido descritos previamente (ver por ejemplo ES-2444490).

5 En otra realización preferida, el compuesto dendrítico comprende además, en la capa externa del dendrímero o dendrón o en el punto focal del dendrón, al menos un grupo funcional de diferente naturaleza al resto de los grupos funcionales, y que se pueden seleccionar entre una molécula etiqueta, un grupo director o un principio activo. Estos dendrímeros y dendrones han sido descritos previamente (ver por ejemplo ES-2444490; P201500669).

10

El término "molécula etiqueta" se refiere en esta descripción a cualquier sustancia biorreconocible, cromóforo, fluoróforo o cualquier otro grupo detectable por técnicas espectrofotométricas, fluorométricas, de microscopía óptica, fluorescencia o confocal, anticuerpos y/o RMN, y que permite fácilmente la detección de otra molécula que por sí sola es difícil de detectar y/o cuantificar. Por ejemplo, y sin limitarnos, el fluoróforo se selecciona de una lista que comprende citocromo, fluoresceína, rodamina y dansilo.

15

Por "grupo director" se entiende a una molécula o grupo funcional capaz de dirigir al compuesto dendrítico específicamente hacia un tipo de células o hacia una zona concreta de una célula, como por ejemplo ácido fólico, un péptido señal o un anticuerpo, entre otros conocidos por cualquier experto en la materia. Dicho grupo director se puede funcionalizar previamente para unirse al compuesto dendrítico.

20

Por "principio activo" o "fármaco" se entiende en la presente invención a toda sustancia química purificada utilizada en la prevención, diagnóstico, tratamiento, mitigación o cura de una enfermedad; para evitar la aparición de un proceso fisiológico no deseado; o para modificar condiciones fisiológicas con fines específicos. Dicho principio activo es capaz de unirse directamente al compuesto dendrítico o con una modificación previa de su estructura para ello.

25

30

La presente invención se refiere también a los usos en biomedicina de las combinaciones péptido/molécula dendrítica.

Preferentemente, esta invención es para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de cáncer de próstata. Sin embargo, no se excluyen otro tipo de cánceres. Más preferentemente, la presente invención se centra en el tratamiento del cáncer de próstata avanzado.

5

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los nanoconjugados de la invención para la elaboración de un medicamento. Más preferiblemente, el medicamento se utiliza para la prevención y/o el tratamiento del cáncer de próstata.

- 10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos una molécula dendrítica y un neuropéptido, según se ha descrito anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, esta composición farmacéutica puede comprender otro principio activo, preferiblemente con propiedades antitumorales. El antitumoral puede ser doxorubicina, metotrexato o compuestos de
- 15 platino u otros con propiedades antitumorales.

Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por un experto en la materia. Como ejemplos de preparaciones farmacéuticas se incluye cualquier composición sólida

20 (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (geles, soluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, nasal, tópica o parenteral.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de la composición calculada para producir el efecto

25 deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de la composición, la edad, estado y antecedentes del paciente, la severidad de la enfermedad, y de la ruta y frecuencia de administración.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes

30 no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Ejemplo de dendrímero carbosilano catiónico de segunda generación con núcleo de tipo polifenólico $[(G_2O_3(S-NMe_2R)_{12})^{12+}]$; (R = $(CH_2)_2OH$ (**1**), Me (**2**)).

5

Figura 2. Ejemplo de dendrón carbosilano catiónico de tercera generación. Por ejemplo, X = OH, NH₂, SH, u otros de interés.

Figura 3. Viabilidad celular en presencia de los péptidos VIP y GHRH, dendrímero **1** y nanoconjugado péptido/dendrimer de células PC3. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

10

Figura 4. Resultados de los ensayos de adhesión en las líneas celulares PC3 del dendrímero **1** solo o unido al péptido VIP o GHRH. Se muestran los valores de la media \pm E.S.M., de 6 experimentos, ** p < 0.01 y *** p < 0.001 frente a los valores del control; # p < 0.05 y ## p < 0.01 respecto al dendrímero.

15

Figura 5. Migración de células PC3 a tiempo 0, 6 y 24 horas con los distintos tratamientos.

Figura 6. Migración de células PC3 a las 6 h. de tratamiento. Se muestran los valores de la media \pm E.S.M., de 1 experimento, con 6 duplicados. * p < 0,05 frente a los valores del control.

20

Figura 7. Ensayo de citometría de flujo en células PC3 a las 24 horas del tratamiento. Se muestran los valores de la media \pm E.S.M., de 2 experimentos, * p < 0.05 frente a los valores del control.

25

EJEMPLOS

Dendrímeros y dendrones.

30

Se analizaron 2 tipos de dendrímeros de estructura carbosilano de segunda generación funcionalizados con distintos grupos amonio $(G_2O_3(S-NMe_2R^+)_{12})$; R = $(CH_2)_2OH$ (**1**), Me (**2**), Figura 1).

Formación de nanoconjugados.

La formación de los nanoconjugados se llevó a cabo mezclando en disolución, preferentemente acuosa en presencia o ausencia de tampón, las moléculas dendríticas y los correspondientes péptidos, en la proporción de interés.

5

En una realización preferida, las mezclas se realizaron directamente sobre las células tumorales. En un pocillo que contiene 25×10^4 células/ml se adicionaron 445 μL de medio RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino (FBS) con un 1% de antibiótico y antimicótico (penicilina/ estreptomicina/ anfotericina). A continuación se añadieron 50 μL de una disolución 10^{-8} M del sistema dendrítico realizada en el mismo medio citado anteriormente. Seguidamente se añadieron 5 μL de péptido (VIP stock 10^{-4} M o GHRH stock 10^{-5} M).

10

En otra realización preferida, también se pueden formar los nanoconjugados previamente a su adición sobre el pocillo que contiene las células. Para ello, se prepara una disolución que contiene 45 μL de medio RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino (FBS) con un 1% de antibiótico y antimicótico (penicilina/ estreptomicina/ anfotericina). A continuación se añaden 50 μL de una disolución 10^{-8} M del sistema dendrítico realizada en el mismo medio citado anteriormente. Seguidamente se añaden 5 μL de péptido (VIP stock 10^{-4} M o GHRH stock 10^{-5} M).

15

20

ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE NANOCONJUGADOS PÉPTIDO/DENDRÍMERO FRENTE A CÁNCER DE PRÓSTATA

25 MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos.

Como controles para los ensayos de toxicidad celular se empleó el mismo medio empleado en la disolución de los nanoconjugados.

30

Células.

Se utiliza la línea celular de próstata humana, PC3, representativa de un estadio andrógeno-independiente de cáncer de próstata, obtenida de ATCC (American Type Culture Collection). Las células se mantienen en medio RPMI-1640 con 10% de suero

fetal bovino (FBS) con un 1% de antibiótico y antimicótico (penicilina/ estreptomicina/ anfotericina). Las células se conservan a 37° C en ambiente húmedo y con un 5% de CO₂.

5 **Ensayo de toxicidad por reducción de sales de tetrazolio.**

Esta técnica es un ensayo colorimétrico basado en la capacidad selectiva de las células vivas para reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio en cristales insolubles de formazán. Este método permite determinar el efecto letal de los compuestos en estudio sobre el metabolismo celular, ya que los daños celulares se traducen en una disminución de la actividad mitocondrial de la célula pudiéndose medir la citotoxicidad de dichas moléculas. Este ensayo se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (MTT, Sigma-Aldrich, St Louis, EE.UU.). Se siembran células PC-3 (15 x 10⁴ células/ml) en placas de 24 pocillos. A las 24 horas se elimina el medio de cultivo y se tratan. El sobrenadante que contiene el tratamiento se retira a las 24 horas y se sustituye por 500 µl de un medio de cultivo al que se añaden 25 µl de MTT en PBS de una concentración 1 mg/ml. Después de 1.5 horas de incubación en condiciones de cultivo, se procede a la retirada del sobrenadante con el exceso de MTT que no reacciona. Los cristales de formazán se disuelven posteriormente con 100 µl de isopropanol. La absorbancia se lee a 570 nm restándole el fondo medido a 620 nm. La viabilidad celular relativa (%) respecto del control (células sin tratar) se calcula en base a la fórmula: [A] test / [A] control x 100.

Ensayos de adhesión.

La suspensión de células PC3 (25 x 10⁴ células/ml) se separa en varias fracciones que dependerán del número de tratamientos a realizar y se mantienen en suspensión durante 1 hora, a 37° C, con agitaciones cada 10 minutos. Las placas con el colágeno que actúa como matriz, se preparan con 100 µl de colágeno tipo I (8 µg/cm²) diluido en ácido acético 10 mM/pocillo, en placas P-96, durante 1 hora, a 37° C, en atmósfera seca para conseguir una fijación completa al pocillo. Pasado ese tiempo, se aspira el colágeno y se lava cuatro veces la placa con PBS. A cada pocillo se adicionan 100 µl de la suspensión celular previamente tratada y se aspira el medio a los 40 minutos. Finalmente, se continúa la valoración de las células adheridas al colágeno mediante un ensayo de MTT, donde se añaden 100 µl de medio sin suero y 0.1 mg/ml MTT a cada pocillo. Tras la retirada del sobrenadante con el exceso de MTT que no reacciona, se

disuelven los cristales de formazán con 100 µl de isopropanol. Se mide la absorbancia a 570 nm restándole el fondo a 620 nm. Los resultados se expresan en % respecto a la absorbancia del control (células sin tratar): $[A] \text{ test} / [A] \text{ control} \times 100$.

5 **Ensayo de Migración.**

Se siembran células PC3 (20×10^4 células/ml) en placas de 24 pocillos. Se tratan las células con el dendrímero y los péptidos 24 horas. Tras eliminar el medio se realiza una herida en cada pocillo y se sigue la progresión de su cierre a distintos tiempos mediante fotografías realizadas con el microscopio invertido acoplado a cámara Motic. Los resultados se procesan midiendo el tamaño de la herida y se representa el % del avance de la herida respecto a la de tiempo cero.

Ensayos de Ciclo Celular.

Se siembran células PC3 ($7,5 \times 10^4$ células/ml) en placas P-6 y se mantienen durante 24 h para conseguir su adherencia, momento en el que se deprivan con medio sin suero durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se realizan los distintos tratamientos y a las 24 horas, las células se lavan con PBS, se levantan con tripsina y se centrifugan. El precipitado de células se fija y se permeabiliza con etanol frío al 70%, durante 5 días, a 4° C. Después, las células se centrifugan para retirar el etanol y se lavan con PBS. Finalmente, se resuspenden en una solución de tinción (PBS, 50 mg/ml de yoduro de propidio (IP) y 10 µg/ml de RNasa), antes del análisis por citometría de flujo con FACSCalibur. La cantidad DNA que se distribuye en las diferentes fases del ciclo celular se analiza con el programa Cyflogic v 1.2.1.

25 **Análisis estadístico.**

Los datos se expresan como la media \pm S.E.M. Los análisis estadísticos se realizan usando el test de Anova y considerando significativos los resultados con $P < 0,05$.

RESULTADOS

30 La combinación estudiada dendrímero/péptido (1/VIP, 1/GHRH)) consigue frenar el crecimiento tumoral y provoca la muerte de las células cancerígenas a concentraciones bajas, dando lugar a un comportamiento anticancerígeno (Fig. 3, resultados de dendrímero 1). Hay que indicar que estos péptidos estudiados (VIP/GHRH) presentan actividad protumoral y que aunque los sistemas dendríticos empleados (1 y 2)

mostraban cierta actividad antitumoral, la combinación con VIP y GHRH es muchísimo más efectiva. Posteriores ensayos mostraban que estos nanoconjugados favorecían la adhesión celular y evitaban procesos de migración de las células tumorales (Fig. 4, 5, 6, resultados del dendrímero **1**). Este efecto se contrastó con el que tendrían solo el dendrímero (**1**) y se observó la ineficacia de estos en evitar la adhesión y la migración.

Para poder conocer si los tratamientos estaban produciendo apoptosis o algún cambio en el ciclo celular se realizaron ensayos de citometría de flujo (Fig. 7, resultados para dendrímero **1**). Como se puede observar ningún tratamiento induce la apoptosis, aunque si hay una variación en el ciclo celular para los tratamientos de los péptidos unidos al dendrímero. Para estos casos se observa que el ciclo se queda parado en la fase de síntesis (S), aumentando el número de células en esta fase y disminuyendo las células de las fases siguientes (G2 y Mitosis).

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de péptido y molécula dendrítica, dendrímero o dendrón, preferentemente de estructura carbosilano aunque sin descartar otras, denominado nanoconjugado.
2. El péptido según la reivindicación anterior es preferentemente un neuropéptido, preferentemente de la familia glucagón/secretina.
3. Nanoconjugado según la reivindicación anterior donde el neuropéptido es el péptido intestinal vasoactivo, VIP, la hormona liberadora de la hormona de crecimiento, GHRH, o el péptido activador de la adenilatociclasa hipofisaria, PACAP, sin descartar otros que tengan una actividad similar.
4. Nanoconjugado según las reivindicaciones 1 a 3, donde el compuesto dendrítico es una cuña dendrítica o un dendrímero. Preferentemente estos compuestos son catiónicos de estructura carbosilano.
5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la capa externa de las moléculas dendríticas, dendrímeros o dendrones, o el punto focal de los dendrones comprende además una función adicional. Estas funciones adicionales se pueden seleccionar entre una molécula etiqueta, preferiblemente un fluoróforo, un grupo director o un principio activo.
6. Procedimiento de obtención de los nanoconjugados descritos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende una reacción entre el péptido y la molécula dendrítica o su combinación en el medio adecuado.
7. Procedimiento de obtención de los nanoconjugados descritos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicha reacción o combinación se lleva a cabo preferentemente en presencia de un disolvente polar como agua, DMSO o un alcohol R^1 -OH, donde R^1 es un grupo alquilo (C_1 - C_{10}), o una mezcla de ellos.
8. Uso de los compuestos descritos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, como principios activos para el desarrollo de un fármaco anticancerígeno.

9. Uso según la reivindicación anterior, donde cáncer es cáncer de próstata, preferentemente cáncer de próstata avanzado.

5 10. Composición farmacéutica que comprende un nanoconjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

10 11. Composición farmacéutica según la reivindicación anterior que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable y/u otro principio activo, preferiblemente un antibiótico, antiinflamatorio o anticancerígeno.

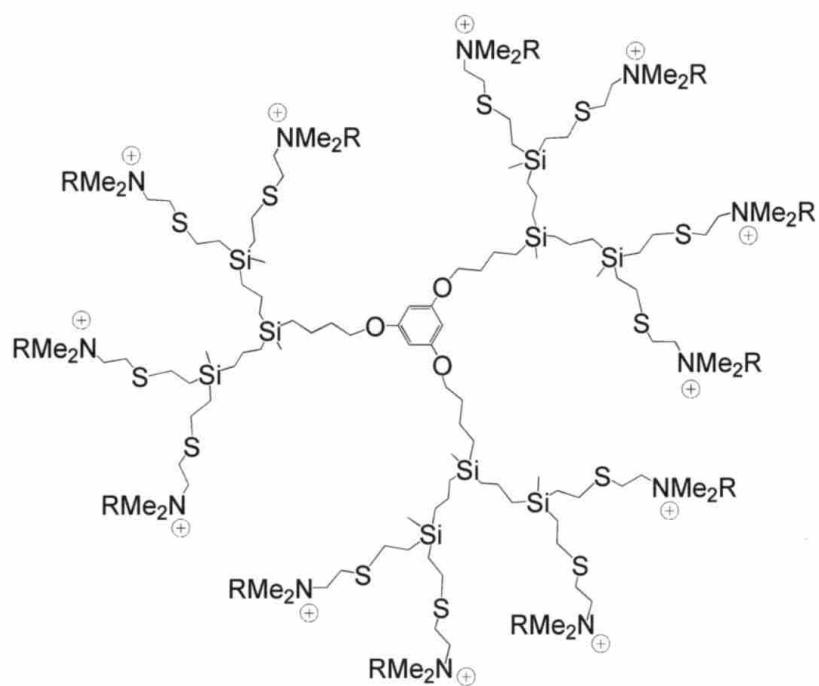


FIG. 1

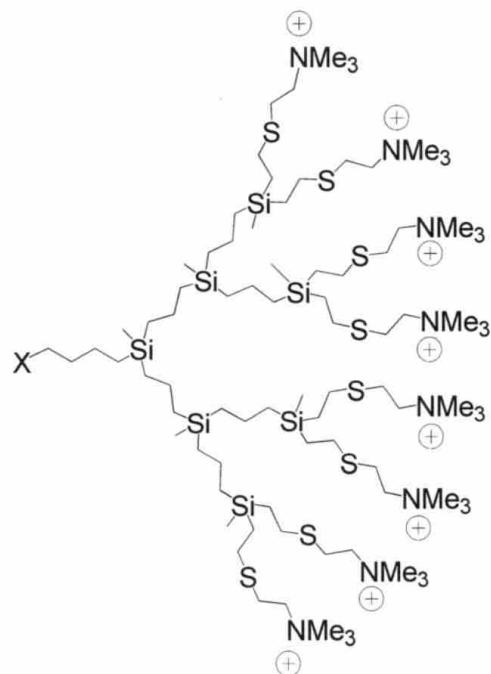


FIG. 2

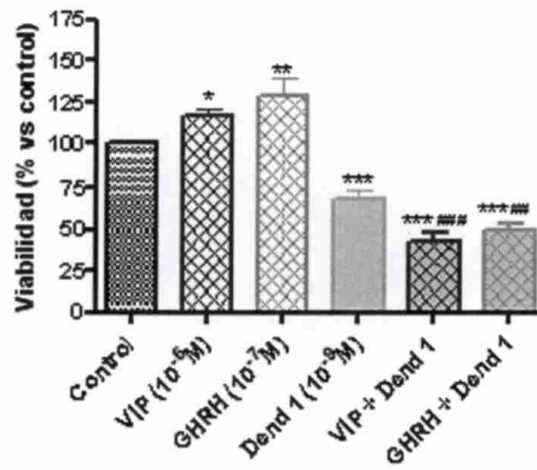


FIG. 3

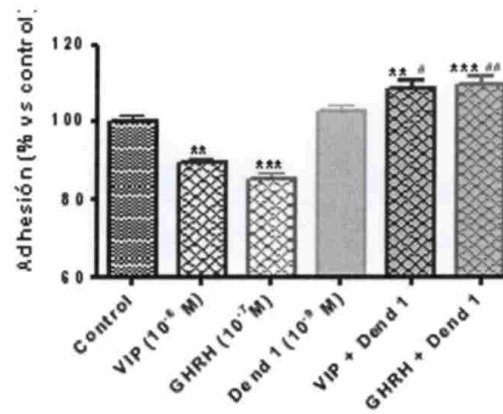


FIG. 4

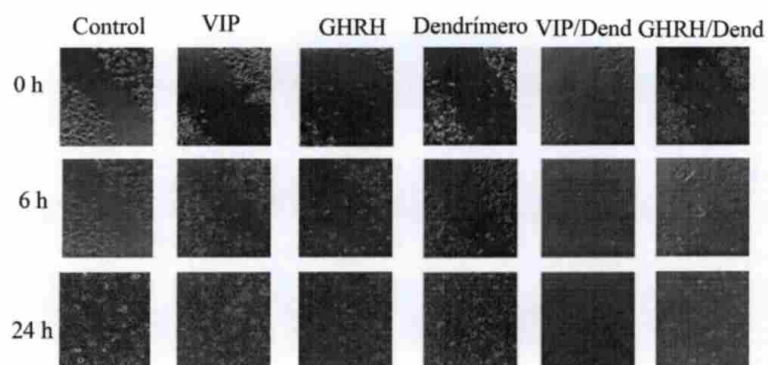


FIG. 5

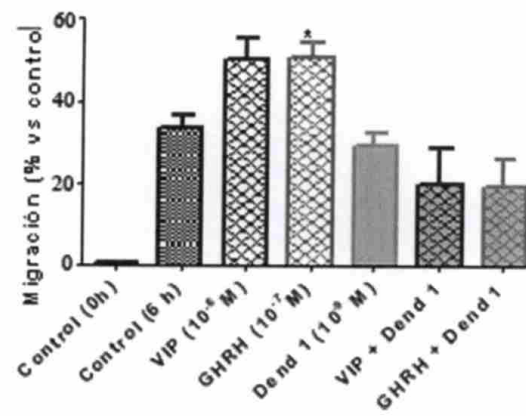


FIG. 6

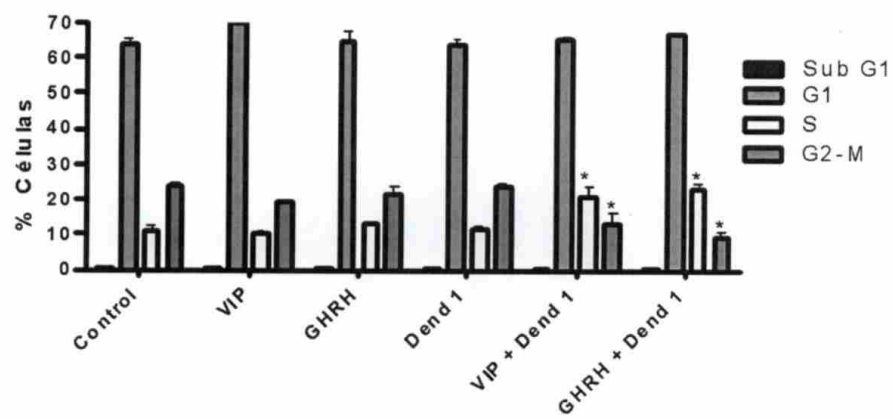


FIG. 7



- ②① N.º solicitud: 201700069
②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.01.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2016122406 A1 (COY DAVID H et al.) 05/05/2016, Párrafo 135, reivindicaciones 12, 13, 14, 45.	1-3, 8-11
X	US 2011268789 A1 (LI MIN et al.) 03/11/2011, resumen, párrafo 37, reivindicaciones 1, 43	1-3, 8-11
X	US 2006078535 A1 (LIVANT DONNA) 13/04/2006, Ejemplos 19 y 21, reivindicación 9.	1, 4-11
X	US 2016015823 A1 (DEMEULE MICHEL et al.) 21/01/2016, Resumen, reivindicaciones.	1, 4-11
X	ES 2444490 A1 (UNIV ALCALA HENARES et al.) 25/02/2014, resumen, reivindicaciones	1, 4-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
08.03.2018

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K14/575 (2006.01)

C07K14/605 (2006.01)

C08G83/00 (2006.01)

A61K38/00 (2006.01)

A61K38/26 (2006.01)

A61K47/30 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C07K, C08G, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, PATENTW, NPL, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.03.2018

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones

SI

Reivindicaciones 1-11

NO**Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones

SI

Reivindicaciones 1-11

NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2016122406 A1 (COY DAVID H et al.)	05.05.2016
D02	US 2011268789 A1 (LI MIN et al.)	03.11.2011
D03	US 2006078535 A1 (LIVANT DONNA)	13.04.2006
D04	US 2016015823 A1 (DEMEULE MICHEL et al.)	21.01.2016
D05	ES 2444490 A1 (UNIV ALCALA HENARES et al.)	25.02.2014

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud se refiere a una combinación de péptido y molécula dendrítica, dendrímero o dendrón, denominada nanoconjugado. Se reivindica asimismo el procedimiento de obtención de los nanoconjugados, el uso en el cáncer de próstata avanzado y la composición farmacéutica que la contiene.

El documento D1 se refiere a análogos del péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) y las composiciones farmacéuticas de uno o más análogos solos o en combinación con otros agentes terapéuticos. Se utilizan como agentes terapéuticos en varios trastornos médicos. Estos compuestos unidos a radionucleidos pueden usarse en la localización, diagnóstico y tratamiento de cánceres y tumores metastatizados. La reivindicación 45 se refiere a un método para administrar transcutáneamente el PACAP tras su encapsulación en dendrímeros (ver párrafo 135).

El documento D2 se refiere al uso del péptido activador de la adenilatociclasa hipofisaria (PACAP) (ver reivindicación 1) para tratar, reducir o inhibir el daño provocado por un agente anticancerígeno en un sujeto administrándole el compuesto análogo del PACAP. En la reivindicación 43 se cita que estos compuestos son administrados transcutáneamente después de su encapsulación en dendrímeros.

Por lo tanto, a la vista de los documentos D1 y D2 se considera que la combinación de péptido y molécula dendrítica a la que se refieren las reivindicaciones 1- 3, en las que se cita específicamente a los neuropéptidos, VIH (péptido intestinal vasoactivo), GHRH (hormona liberadora de la hormona de crecimiento) o PACAP (péptido activador de la adenilato hipofisaria), sus composiciones farmacéuticas, así como su uso en el tratamiento del cáncer (reivindicaciones 8-11) carecen de novedad y de actividad inventiva de acuerdo con los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.

El documento D3 se refiere a una composición que comprende un dendrímero y al menos un péptido unido a dicho dendrímero. Además dicho dendrímero se puede unir a un agente quimioterapéutico. Se utiliza para el tratamiento del cáncer, en el estudio de la capacidad que tienen las células cancerígenas en invadir los tejidos y causar metástasis y con el objeto de usar dichos fármacos para inhibir la invasión y crecimiento tumoral. Entre otros se cita el tumor de próstata (ejemplos 19 y 21 y reivindicación 9).

El documento D4 se refiere a un conjugado péptido dendrímero y uno o más agentes terapéuticos, de diagnóstico o de imagen para el transporte de dichos agentes a través de la barrera hematoencefálica o a través de determinados tipos de células tales como células cancerígenas. Así mismo se describen sus métodos de preparación (ver reivindicación 73).

El documento D5 describe compuestos dendríticos carbosilanos y su uso para el transporte de moléculas y para elaborar un medicamento para el tratamiento del cáncer en terapia génica (ver reivindicaciones).

A la vista de los documentos D3-D5, son conocidos en el estado de la técnica los conjugados péptido dendrímero, y su uso como transportadores de agentes terapéuticos tales como agentes anticancerígenos. En el documento D5 se cita el dendrímero con estructura de carbosilano reivindicado como preferente en las reivindicaciones 1 y 4. Por lo tanto, las reivindicaciones 1 y 4-11 carecen de novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 LP.

En consecuencia, la materia correspondiente a las reivindicaciones 1-11 de la presente solicitud carece de novedad y de actividad inventiva según los artículos los artículos 6.1 y 8.1 LP.