

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 327**

51 Int. Cl.:

A61K 47/50 (2007.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

A61K 31/353 (2006.01)

C08G 65/331 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2008 PCT/SG2008/000409**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2009 WO09054813**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2008 E 08841797 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2214715**

54 Título: **Método de administración de un agente anticanceroso a una célula**

30 Prioridad:

23.10.2007 US 960969 P

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

01.08.2018

73 Titular/es:

**AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH (100.0%)
1 FUSIONOPOLIS WAY 20-10 CONNEXIS
SINGAPORE 138632, SG**

72 Inventor/es:

**YING, JACKIE Y.;
CHUNG, JOO EUN y
KURISAWA, MOTOICHI**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 677 327 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

Método de administración de un agente anticanceroso a una célula

5 **Referencia cruzada con una solicitud relacionada**

Esta solicitud reivindica el beneficio y la prioridad de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos N.º 60/960.969, presentada el 23 de octubre de 2007.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a un método *in vitro* para administrar un agente anticanceroso a una célula, que incluye una célula tumoral en un sujeto.

15 **Antecedentes de la invención**

Los flavonoides son uno de los grupos de polifenoles vegetales más numerosos y mejor estudiados. Los flavonoides consisten en un grupo grande de sustancias polifenólicas de bajo peso molecular que se encuentran de forma natural en las frutas y verduras, y que forman parte integral de la dieta humana. Las hojas de té verde secas pueden contener hasta 30 % de flavonoides en peso, incluido un alto porcentaje de flavonoides conocidos como catequinas (derivados de flavan-3-ol o flavonoides a base de catequina), incluyendo (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, (+)-catequina, galato de (-)-epicatequina y galato de (-)-epigallocatequina.

En los últimos años, estas catequinas del té verde han atraído mucha atención porque se sabe que tienen propiedades biológicas y farmacológicas, que incluyen propiedades antibacterianas, antineoplásicas, antitrombóticas, vasodilatadoras, antioxidantes, antimutagénicas, anticancerosas, hipercolesterolémicas, antivíricas y antiinflamatorias, que se han demostrado en numerosos estudios en seres humanos, animales e *in vitro* (Jankun J., *et al. Nature* **387**, 561 (1997)); Bodoni A. *et al. J. Nutr. Biochem.* **13**, 103-111 (2002); Nakagawa K. *et al. J. Agric. Food Chem.* **47**, 3967-3973 (1999)). Estas propiedades biológicas y farmacológicas son potencialmente beneficiosas para prevenir enfermedades y proteger la estabilidad del genoma.

Se cree que muchos de los efectos beneficiosos de las catequinas están relacionados con las acciones antioxidantes de las catequinas (Terao J., *et al. Arch Biochem. Biophys.* **308**, 278-284 (1994)). Entre las catequinas, se cree que el galato de (-)-epigallocatequina (EGCG), que es un componente mayoritario del té verde, tiene la actividad más alta, posiblemente debido al anillo trihidroxilo B y al resto éster de galato en la posición C3 (Isemura M., *et al. Biofactors* **13**, 81-85 (2000); Ikeda I., *et al. J. Nutr.* **135**, 155 (2005); Lill G., *et al. FEBS Letters* **546**, 265-270 (2003); Sakanaka S. and Okada Y. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1688-1692 (2004)); Yokozawa T., *et al., J. Agric. Food Chem.* **48**, 5068-5073 (2000)).

En general, la semivida de la actividad de los flavonoides se limita a unas pocas horas dentro del cuerpo; el metabolismo de estos compuestos aún no se ha establecido. A pesar de las favorables propiedades antioxidantes y anticancerígenas de las catequinas, incluido el EGCG, no es práctico alcanzar un nivel terapéutico de este compuesto en el cuerpo ingiriendo directamente una gran cantidad de té verde, debido a la restricción de volumen inherente. Es decir, para obtener un beneficio terapéutico o farmacológico de los flavonoides a través solo de la dieta, sería necesario ingerir una cantidad de alimentos y bebidas mayor de lo que es práctico consumir. Además, se ha descrito actividad prooxidante de varios flavonoides, incluido el EGCG, por lo que la ingestión directa de té verde crudo es un medio menos eficaz de administrar EGCG (Yen G. C., *et al. J. Agric. Food Chem.* **45**, 30-34 (1997)); Yamanaka N., *et al. FEBS Lett.* **401**, 230-234 (1997)); Roedig-Penman A. y Gordon M. H. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, **45**, 4267-4270).

Por otro lado, una fracción de peso molecular relativamente alto de polifenoles vegetales extraídos (prociandinas) y (+)-catequina y rutina sintéticamente oligomerizadas han demostrado tener propiedades fisiológicas mejoradas tales como actividad antioxidante y anticancerígena en comparación con los flavonoides de bajo peso molecular (Zhao J., *et al. Carcinogenesis*, 1999, **20**, 1737-1745; Ariga T. and Hamano M. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 2499 - 2504 (1990)); Chung J. E., *et al. Biomacromolecules* **5**, 113-118 (2004)); Kurisawa M., *et al. Biomacromolecules* **4**, 1394-1399 (2003)); Hagerman A. E., *et al. J. Agric. Food Chem.* **46**, 1887 (1998) y sin efectos pro-oxidantes (Hagerman A. E., *et al. J. Agric. Food Chem.* **46**, 1887 (1998)); Li C. y Xie B. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 6362 (2000)). Sin embargo, no se espera que los flavonoides de alto peso molecular naturales o sintetizados sean absorbidos y transportados a otros tejidos después de la ingestión, ya que estos compuestos son generalmente grandes, forman complejos fuertes con proteínas y son resistentes a la degradación (Zhao J., *et al. Carcinogenesis*, 1999, **20**, 1737-1745),

En los casos de flavonoides que se consumen a través de la ingesta oral de alimentos y bebidas, los flavonoides pueden desempeñar un papel como antioxidantes para proteger el tracto digestivo del daño oxidativo durante la digestión. Sin embargo, se puede esperar que los flavonoides permanezcan solo en el tracto digestivo y, por lo tanto, es probable que sus beneficiosas actividades fisiológicas no se utilicen en otros tejidos. Además, su fuerte hidrofobicidad así como su tendencia a formar complejos con proteínas dificulta la administración parenteral de estos

compuestos.

Sumario de la invención

5 La presente invención proporciona un método de administración *in vitro* de agentes anticancerosos bioactivos a una célula, incluida una célula tumoral, utilizando conjugados de flavonoides y vehículos de administración descritos previamente en la Solicitud internacional publicada WO 2006/124000 y en la solicitud de los Estados Unidos publicada 2008/102052. El agente anticanceroso es un anticuerpo dirigido contra un marcador de la superficie de células tumorales.

10 La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que el uso de vehículos de administración a base de flavonoides para administrar agentes anticancerosos a una célula da como resultado un efecto sinérgico entre el agente bioactivo anticanceroso y los flavonoides. Por lo tanto, estos conjugados y vehículos de administración combinan los efectos terapéuticos sinérgicos asociados a la porción de flavonoide que actúa como vehículo y el agente anticanceroso, que es un anticuerpo dirigido contra un marcador de la superficie de células tumorales que debe administrarse.

15 En un aspecto, se proporciona un nanocomplejo micelar definido en la reivindicación 1 que comprende un agente anticanceroso que es un anticuerpo dirigido contra un marcador de la superficie de células tumorales y un conjugado de un agente de administración que contiene un aldehído libre y un flavonoide, teniendo el agente de administración conjugado la posición C6 y/o C8 del anillo A del flavonoide.

20 En otro aspecto, se proporciona un método de administración *in vitro* de un agente anticanceroso a una célula que comprende poner en contacto los vehículos de administración como se describe en la presente memoria con la célula, como se define en la reivindicación 7.

25 En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica, como se define en la reivindicación 8, que comprende el vehículo de administración tal como se describe en la presente memoria.

30 En otro aspecto, se proporciona el uso del vehículo de administración tal como se describe en la presente memoria para administrar un agente anticanceroso a una célula en un sujeto, como se define en la reivindicación 9.

35 Otros aspectos y características de la presente invención serán evidentes para los expertos en la materia tras la revisión de la siguiente descripción de realizaciones específicas de la invención junto con las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

En las figuras, que ilustran, a modo de ejemplo solamente, realizaciones de la presente invención,

40 La **Figura 1** es un gráfico que representa la citotoxicidad de (□) EGCG, (▲) OEGCG y (○) PEG-EGCG en HMEC. N = 5 para las muestras y N = 8 para el control;

45 La **Figura 2** es un gráfico que representa el tamaño del complejo micelar en (○) ausencia y (●) presencia de suero. N = 3;

La **Figura 3** es un gráfico que representa la intensidad de fluorescencia de (□) sin BSA-FITC, (○) complejo FITC-BSA y OEGCG, (Δ) (FITC-BSA + OEGCG) en el complejo PEG-EGCG en presencia de proteinasa K; y (■) sin FITC-BSA en ausencia de proteinasa K. N = 3;

50 La **Figura 4** es un gráfico que representa la proliferación celular *in vitro* de células SKBR-3 en presencia de (□) PEG-EGCG, (■) OEGCG, (Δ) Herceptin, (●) (Herceptin + OEGCG) en el complejo PEG-EGCG, (▲) (BSA + OEGCG) en el complejo PEG-EGCG, y (○) control (células no tratadas). N = 5 para las muestras y N = 8 para el control;

55 La **Figura 5** es un gráfico que representa el tamaño de (Herceptin + OEGCG) en el complejo PEG-EGCG sometido a dilución en suspensión. N = 3.

60 La **Figura 6** es un gráfico que representa la proliferación *in vitro* de células SKBR-3 en presencia de OEGCG, PEG-EGCG, Herceptin, (Herceptin + OEGCG) en el complejo PEG-EGCG, y (BSA + OEGCG) en el complejo PEG-EGCG (barras de izquierda a derecha en cada grupo). El porcentaje de proliferación celular se normalizó con el control en cada punto de tiempo. N = 5 para las muestras y N = 8 para el control; y

65 La **Figura 7** es un gráfico que representa el tamaño tumoral en ratones Balb/desnudo que contienen tumor tratados dos veces a la semana durante un mes con (Δ) complejo micelar más Herceptin, (□) Herceptin solo, o (○) control con PBS.

Descripción detallada

Se sabe que los flavonoides tienen una variedad de propiedades biológicas, que incluyen efectos contra el cáncer, que inhiben el crecimiento de las células cancerosas. Los vehículos de administración que comprenden flavonoides se describieron previamente en la solicitud internacional publicada WO 2006/124000 y en la solicitud de los Estados Unidos publicada 2008/102052.

Sorprendentemente, los inventores han descubierto que la combinación del vehículo de administración de flavonoides y el agente anticanceroso bioactivo tiene un efecto anticanceroso sinérgico mayor que los efectos combinados de cada uno de los vehículos de administración de flavonoides y el agente anticanceroso bioactivo cuando se usan solos. Por lo tanto, dichos vehículos de administración cargados con un agente anticanceroso proporcionan una forma eficaz de administrar agentes anticancerosos a una célula, aprovechando el efecto sinérgico entre la actividad anticancerosa de la porción de flavonoide del vehículo de administración y el efecto anticanceroso del agente anticanceroso. El agente anticanceroso en el nanocomplejo micelar de la invención es un anticuerpo dirigido contra un marcador de la superficie de células tumorales.

Los inventores desarrollaron un vehículo de administración que contenía un agente anticanceroso tal como una proteína, ácido nucleico o fármaco, por autoensamblaje usando flavonoides y conjugados de flavonoides tales como EGCG. Los vehículos de administración se formaron por autoensamblaje. Por ejemplo, los vehículos de administración se sintetizaron mediante (i) un proceso de autoensamblaje en dos etapas que implicaba el ensamblaje de (-)-epigallocatequina-3-O-galato oligomérico (OEGCG) y el agente anticanceroso y después el ensamblaje del complejo OEGCG-agente anticanceroso preformado con un conjugado de poli(etilenglicol) (PEG) y EGCG (PEG-EGCG); y (ii) un proceso de autoensamblaje de una sola etapa que implica el ensamblaje de un conjugado de PEG y OEGCG (PEG-OEGCG) y el agente anticanceroso. Ambos vehículos de administración se formaron como complejos micelares estables y altamente orientados cargados con el agente anticanceroso mediante el autoensamblaje espontáneo en una solución acuosa suave. Los nanocomplejos micelares resultantes muestran característicamente una cubierta externa de PEG, con un núcleo interno comprendido por un complejo de agente anticanceroso OEGCG. El vehículo de administración usado en la presente invención se define en la reivindicación 1.

Dado que la formación de un nanocomplejo micelar se basa principalmente en la interacción hidrofóbica y el enlace de hidrógeno, los vehículos de administración descritos en la presente memoria pueden usarse para cargar una amplia variedad de agentes anticancerosos para una administración mejorada a una célula.

Los vehículos de administración están diseñados para aprovechar el efecto mejorado de permeabilidad y retención (EPR) y para evitar la absorción del sistema reticuloendotelial (RES) cuando se administran *in vivo*, proporcionando la acumulación selectiva en sitios de cáncer. Idealmente, los vehículos de administración conservan la estabilidad tanto de las moléculas de flavonoides como del agente anticanceroso de la pérdida de actividad y evitando la degradación durante la administración, ejerciendo un efecto terapéutico sinérgico cuando se administran a una célula. El vehículo de administración puede enmascarar la actividad del flavonoide y la actividad del agente anticanceroso secuestrando estos restos dentro del núcleo interno del vehículo de administración hasta que se administra y libera con éxito en la célula, restaurando las actividades respectivas solo después de la disociación del vehículo de administración al sitio de una célula.

Para demostrar los efectos terapéuticos sinérgicos por el vehículo de administración, la proteína anticancerosa Herceptin (trastuzumab) se cargó en el complejo micelar, como se describe en el Ejemplo 1 siguiente. El complejo micelar mantuvo su integridad y mostró buena estabilidad en presencia de suero sin cambio de tamaño en función del tiempo, y la proteína se protegió de forma segura de la proteólisis dentro del complejo micelar. Se demostró una mayor inhibición con el vehículo de administración cargado con Herceptin en comparación con los componentes individuales (OEGCG, PEG-EGCG y Herceptin).

Dado que la formación del vehículo de administración está principalmente determinada por la interacción hidrofóbica, puede ser disociada por competidores hidrofóbicos, tales como moléculas anfífilas. De este modo, el vehículo de administración puede disociarse mediante moléculas bioanfífilas (tales como lípidos de membrana plasmática) para liberar el flavonoide terapéutico contenido y compuestos anticancerosos cuando el vehículo de administración se acumula en el sitio celular diana.

Por lo tanto, se proporciona un método para administrar un agente anticanceroso a una célula. Se utiliza un vehículo de administración que contiene un flavonoide y un agente anticanceroso, como se describió previamente en la solicitud internacional publicada WO 2006/124000 y en la solicitud de los Estados Unidos publicada 2008/102052 y como se describe a continuación. El vehículo de administración se pone en contacto a continuación con la célula a la que se administra el agente anticanceroso.

Conjugados de flavonoides y vehículos de administración

Para aumentar la disponibilidad de compuestos flavonoides beneficiosos, la conjugación de flavonoides a varios agentes de administración a través de un grupo aldehído libre en el agente de administración al anillo A del flavonoide permite la modificación de las propiedades físicas del flavonoide sin alterar la estructura del polifenol del flavonoide, al tiempo que aumentan las propiedades biológicas y farmacológicas del flavonoide.

Es decir, la conjugación mediada por aldehído de un agente de administración al flavonoide da como resultado la unión del agente de administración en la posición C6 y/o C8 del anillo de flavonoide A, y no altera ni afecta los anillos B y C del flavonoide ni a los diversos grupos hidroxilo en el flavonoide.

La conjugación de un agente de administración a un flavonoide puede proporcionar una composición que es adecuada para la administración a un sujeto incorporando el flavonoide en un vehículo particular formado con el agente de administración, y puede permitir la administración de concentraciones más altas de flavonoides que las que se pueden obtener a través de la dieta. El agente de administración puede proporcionar estabilidad a la composición, dando como resultado una composición que se metaboliza o degrada más lentamente, y que de este modo puede tener una semivida más larga en el cuerpo que el flavonoide no conjugado solo. Por ejemplo, el agente de administración puede ser de tal naturaleza que el flavonoide se incorpore en una composición que mejore la solubilidad en agua del flavonoide, lo que puede evitar la absorción por el sistema reticuloendotelial y el posterior aclaramiento de los riñones, dando como resultado una semivida más larga en el cuerpo. La conjugación de otros agentes de administración puede proteger al flavonoide de la degradación enzimática. El conjugado usado en la presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Un agente de administración puede conjugarse con un flavonoide haciendo reaccionar el agente de administración con el flavonoide en presencia de un catalizador ácido, teniendo el agente de administración un grupo aldehído libre.

El flavonoide es galato de (-)-epigallocatequina monomérico u oligomérico. Se cree que galato de (-)-epigallocatequina (EGCG) tiene la mayor actividad entre los flavonoides a base de catequinas, posiblemente debido al anillo trihidroxilo B y al resto éster galato en la posición C3 de este flavonoide.

El agente de administración es un polietilenglicol terminado en aldehído.

La siguiente descripción se refiere a una realización en la que el flavonoide es un flavonoide a base de catequina y en el que el agente de administración es un polímero. Sin embargo, se entenderá que la reacción de condensación de aldehído entre un grupo químico que contiene aldehído y un flavonoide es aplicable a la conjugación de cualquier agente de administración que tenga un grupo aldehído libre, que incluye el consiguiente tratamiento ácido del agente de administración, con cualquier flavonoide, como se describe encima.

Por lo tanto, la reacción puede implicar la conjugación de un polímero que contiene un grupo aldehído libre o un grupo que puede convertirse en un grupo aldehído libre en presencia de ácido en un flavonoide a base de catequina.

El flavonoide a base de catequina puede ser una sola unidad monomérica de un flavonoide a base de catequina o puede ser un oligómero de uno o más flavonoides a base de catequina. El flavonoide a base de catequina usado en la presente invención es galato de (-)-epigallocatequina monomérico o galato de (-)-epigallocatequina oligomérico. Como se indicó anteriormente, la conjugación de un polímero con un flavonoide da como resultado un aumento de las propiedades biológicas o farmacológicas del flavonoide. Además, un oligómero del flavonoide a base de catequina tiende a tener niveles amplificadas o aumentados de las propiedades biológicas y farmacológicas asociadas con los flavonoides a base de catequina, e incluso puede tener efectos prooxidantes reducidos que a veces se asocian con flavonoides monoméricos a base de catequina. Por lo tanto, el flavonoide a base de catequina es un flavonoide oligomerizado a base de catequina que tiene propiedades flavonoides amplificadas o aumentadas.

Se conocen oligómeros de flavonoides a base de catequina, que incluyen oligómeros preparados mediante acoplamiento oxidativo catalizado por enzima y mediante oligomerización mediada por aldehído. Un proceso de oligomerización mediado por aldehído da como resultado un oligómero no ramificado que tiene enlaces definidos, por ejemplo a través de enlaces carbono-carbono tales como puentes CH-CH₃ unidos desde la posición C6 o C8 en el anillo A de un monómero hasta la posición C6 o C8 en el anillo A del próximo monómero, incluyendo en cualquiera de las posibles estereconfiguraciones, cuando corresponda. Por lo tanto, el enlace CH-CH₃ puede estar entre la posición C6 del anillo A de un monómero y cualquiera de las posiciones C6 o C8 del siguiente monómero o puede estar entre la posición C8 del anillo A del primer monómero y cualquiera de las posiciones C6 o C8 del próximo monómero.

El oligómero del flavonoide a base de catequina puede ser de 2 o más unidades monoméricas unidas entre sí. En ciertas realizaciones, el oligómero de flavonoide a base de catequina tiene de 2 a 100 unidades monoméricas flavonoides, de 10 a 100, de 2 a 80, de 10 a 80, de 2 a 50, de 10 a 50, de 2 a 30, de 10 a 30, de 20 a 100, de 30 a 100 o de 50 a 100 unidades monoméricas.

- El polímero descrito en la presente memoria puede ser cualquier polímero que tenga un grupo aldehído libre antes de la conjugación con el flavonoide a base de catequina, o que tenga un grupo que se convierta en un grupo aldehído en presencia de ácido, por ejemplo un grupo acetal. Además, se entenderá que el polímero debe ser no tóxico, biocompatible y adecuado para uso farmacológico. El polímero también puede tener otras propiedades deseables, por ejemplo, el polímero puede tener baja inmunogenicidad, y puede ser biodegradable o no biodegradable dependiendo de la aplicación biológica deseada de la composición, por ejemplo, para la liberación controlada de los flavonoides a base de catequina y el agente anticanceroso en un sitio particular en un cuerpo. En el nanocomplejo micelar de la invención, el conjugado comprende un polietilenglicol terminado en aldehído.
- El polímero se puede elegir en función de sus características particulares y su capacidad para formar ciertos tipos de vehículos de administración. Por ejemplo, el polímero puede ser un poli(etilenglicol) terminado en aldehído, o puede ser ácido hialurónico derivatizado con un grupo aldehído, o un derivado de tales polímeros. Como alternativa, el polímero puede ser un dendrímero de fenoximetil(metilhidrazono) (PMMH), por ejemplo, un núcleo de ciclotrifosfaceno PMMH o núcleo de tiofosforilo PMMH. El polímero también puede ser cualquier polímero biológico, modificado para que contenga un grupo aldehído libre o un grupo que sea convertible en un aldehído en presencia de ácido, por ejemplo, una proteína modificada con aldehído, péptido, polisacárido o ácido nucleico. En una realización particular, el polímero es un poli(etilenglicol) terminado en aldehído (PEG-CHO). En otra realización particular, el polímero es ácido hialurónico derivatizado con aldehído, ácido hialurónico conjugado con aminoacetaldehído dietilacetal o cualquiera de los polímeros de ácido hialurónico mencionados anteriormente derivatizados con tiramina. El conjugado utilizado en la invención comprende el siguiente polímero: polietilenglicol terminado en aldehído.
- El grupo aldehído libre en el polímero permite la conjugación del polímero de una manera controlada en la posición C6 o C8 del anillo A, o ambas, de la estructura flavonoide, evitando así la alteración de la estructura flavonoide, especialmente los anillos B y C del flavonoide, y así conservar las propiedades biológicas y farmacológicas beneficiosas del flavonoide.
- El polímero se conjuga con el flavonoide a base de catequina a través de una reacción del grupo aldehído del polímero con la posición C6 y/o C8 del anillo A del flavonoide a base de catequina.
- El conjugado se sintetiza usando catálisis ácida de una condensación del grupo aldehído del polímero con el flavonoide a base de catequina, o usando ácido para convertir un grupo funcional en el polímero en un aldehído libre antes de la condensación del grupo aldehído con el flavonoide a base de catequina.
- Para conjugar el polímero y el flavonoide a base de catequina, el polímero y el flavonoide a base de catequina se pueden disolver por separado en un disolvente adecuado. El polímero con el aldehído libre se añade, por ejemplo, por adición gota a gota, a la solución que contiene el flavonoide a base de catequina, en presencia de un ácido. La reacción se deja completar. Después de la reacción de conjugación, se puede eliminar el exceso de polímero sin reaccionar o flavonoide a base de catequina de la composición conjugada, por ejemplo mediante diálisis o mediante tamizado molecular.
- La relación entre flavonoide a base de catequina y polímero puede variarse, de modo que solo hay un resto polimérico unido a la porción de flavonoide a base de catequina del polímero, o de forma que hay una porción de flavonoide a base de catequina unida en más de una posición en el polímero, o de forma que la porción de flavonoide a base de catequina tenga dos porciones de polímero unidas, una en una cualquiera de las posiciones C6 y C8 del flavonoide a base de catequina.
- La relación entre polímero y flavonoide a base de catequina en la composición final puede controlarse mediante la relación entre reactivos de partida. Por ejemplo, cuando la relación molar entre resto de polímero y resto de flavonoide a base de catequina es aproximadamente 1, se unirá un único resto de polímero a un único resto flavonoide a base de catequina (pueden usarse monoméricos u oligoméricos). Sin embargo, a mayores concentraciones de polímero, por ejemplo, en una relación molar 10:1 entre polímero y flavonoide a base de catequina, se puede obtener una composición que tenga una estructura de tres bloques de polímero-flavonoide-polímero.
- También se contempla un conjugado de un polímero que contiene un aldehído libre y un flavonoide a base de catequina, que tiene el polímero conjugado en la posición C6 y/o C8 del anillo A del flavonoide.
- La conjugación del polímero también permite la incorporación de flavonoides a base de catequina en diversas composiciones o vehículos. Mediante la selección del polímero particular que contiene un grupo aldehído libre basado en las propiedades físicas del polímero, es posible incorporar flavonoides en una variedad de diferentes tipos de vehículos, permitiendo la administración de altas concentraciones de flavonoides en diferentes contextos a varias áreas específicas del cuerpo.
- Por lo tanto, el conjugado resultante de la reacción descrita anteriormente puede formarse en un vehículo de administración, dependiendo de la naturaleza de la porción de polímero del conjugado. El vehículo de administración

se puede usar para administrar el flavonoide a base de catequina a un cuerpo, incluido un sitio específico en un cuerpo, dependiendo de la naturaleza del vehículo de administración.

Agentes anticancerosos

5 Se incluye un agente anticanceroso en el vehículo de administración, que luego se pone en contacto con una célula a la que se administrará el agente anticanceroso. Por tanto, se proporciona un vehículo de administración que comprende un flavonoide a base de catequina conjugado con un polímero a través de un grupo aldehído libre en el polímero, comprendiendo además el vehículo de administración un agente anticanceroso, que es un anticuerpo dirigido contra un marcador de la superficie de células tumorales.

15 El agente anticanceroso divulgado en la presente memoria puede ser cualquier agente que tenga un efecto anticanceroso sobre una célula, incluyendo un efecto antitumoral, tal como un efecto, citotóxico, apoptótico, antimitótico, anti-angiogénesis o de inhibición del efecto de la metástasis. El efecto anticanceroso pretende incluir la inhibición o reducción del crecimiento de las células tumorales, la inhibición o la reducción de la carcinogénesis, la destrucción de las células tumorales o la inhibición o reducción de las propiedades carcinogénicas o tumorigénicas de una célula, incluida una célula tumoral. El agente anticanceroso usado en la invención es un anticuerpo dirigido contra un marcador de la superficie de células tumorales.

20 Un agente contra el cáncer incluye una proteína, un ácido nucleico, una molécula pequeña o un fármaco. Un agente anticanceroso que es una proteína puede ser un péptido, un anticuerpo, una hormona, una enzima, un factor de crecimiento o una citocina. Un agente anticanceroso que es un ácido nucleico puede ser ADN o ARN monocatenario o bicatenario, un ARN corto en horquilla, un ARNsi, o puede comprender un gen que codifica un producto anticanceroso, un agente quimioterapéutico o un inhibidor de la angiogénesis. El agente anticanceroso usado en la invención es un anticuerpo, p. ej., un anticuerpo monoclonal, dirigido contra un marcador de la superficie de células tumorales. El agente anticanceroso puede ser Herceptin (trastuzumab) o TNP470.

Formación del vehículo de administración que contiene un agente anticanceroso

30 El vehículo de administración es un nanocomplejo micelar, que es adecuado para administración parenteral de un flavonoide a base de catequina y un agente anticanceroso a una célula, que incluye una célula localizada en un sitio particular dentro del cuerpo de un sujeto.

35 Para formar el vehículo de administración que contiene el agente anticanceroso, se elige que el polímero tenga propiedades que le permitan ensamblarse con la porción de flavonoide a base de catequina de la composición, protegiendo al flavonoide del entorno de la solución. Si se elige un disolvente adecuado en el que la porción de polímero del conjugado es soluble y es más soluble que el flavonoide a base de catequina, el conjugado se autoensamblará, excluyendo la solución del núcleo de flavonoide, permitiendo así el ensamblaje de complejos micelares.

40 En el vehículo de administración de nanocomplejos micelares, el polímero elegido es PEG terminado en aldehído, o un derivado del mismo. El PEG es un polímero, ampliamente utilizado como ingrediente farmacológico, y posee buenas características hidrófilas, no tóxicas, no inmunogénicas y de biocompatibilidad con baja biodegradabilidad.

45 Al conjugar PEG-CHO con un flavonoide a base de catequina, se forma un conjugado que tiene fuertes tendencias de autoensamblaje. En una realización, el PEG se conjuga con un monómero de un flavonoide a base de catequina, para formar un PEG-flavonoide. El vehículo de administración se forma junto con flavonoides a base de catequina no conjugados y el agente anticanceroso. Por lo tanto, el núcleo central contiene concentraciones relativamente altas de un flavonoide y el agente anticanceroso, mientras que la cubierta externa del nanocomplejo micelar comprende el flavonoide PEG monomérico conjugado, y se ensambla en un proceso de dos etapas. En una realización particular, el núcleo central es EGCG oligomérico (OEGCG) y el núcleo externo está constituido por un conjugado PEG-EGCG.

55 La formación de este ensamblaje en dos etapas del vehículo de administración da como resultado el enmascaramiento parcial temporal o completo de las actividades biológicas del flavonoide oligomérico que se incorpora al núcleo del vehículo de administración, así como la protección del agente anticanceroso de la degradación antes de la administración. administración a la célula. Por ejemplo, mientras se ensamblan en el núcleo del vehículo de administración, las propiedades aumentadas del EGCG oligomerizado están menos disponibles, debido a las interacciones físicas con otras moléculas en la porción del núcleo ensamblado del vehículo de administración. Tras la liberación del vehículo de administración, por ejemplo mediante fusión del vehículo con una membrana celular de fosfolípidos, los componentes de la administración se disocian, desenmascarando las propiedades biológicas del flavonoide oligomérico a base de catequina, y liberando el agente anticanceroso para su administración en la célula.

65 Esta realización del vehículo de administración es muy adecuada para administrar el agente anticanceroso. Dado que los flavonoides a base de catequina tienen una estructura central rígida de múltiples anillos, estas moléculas se asocian bien con agentes anticancerosos como proteínas y ácidos nucleicos, así como con otras moléculas que

contienen estructuras de anillo, probablemente mediante el apilamiento de los anillos de catequina con el anillo o anillos en el agente anticanceroso. Por lo tanto, se puede usar un flavonoide oligomérico a base de catequina para asociarlo con el agente anticanceroso antes del ensamblaje en el nanocomplejo micelar.

5 La concentración del agente anticanceroso se elige dependiendo de la cantidad total de agente anticanceroso que se administrará a un sitio particular en un cuerpo, y de la cantidad de agente anticanceroso que se puede incluir en el nanocomplejo micelar sin desestabilizar la estructura micelar. En ciertas realizaciones, el agente anticanceroso puede constituir hasta 50 %, o hasta 40 %, p/p del complejo micelar.

10 La actividad biológica del agente anticanceroso también se enmascara de forma temporalmente parcial o completamente mientras se incorpora en los presentes vehículos de administración. Al igual que con el flavonoide a base de catequina oligomérico, las propiedades biológicas del agente anticanceroso están enmascaradas o secuestradas, lo que las hace menos disponibles mientras el agente anticanceroso se ensambla en el vehículo de administración, lo que significa que el agente anticanceroso no está disponible para ejercer actividad anticancerígena o interactuar con otras moléculas de forma bioactiva mientras está contenido en el vehículo de administración, y también está protegido contra la actividad de otras moléculas. Tras la liberación del agente anticanceroso del vehículo de administración, las propiedades biológicas del agente anticanceroso están nuevamente disponibles, y el agente anticanceroso puede ejercer un efecto anticanceroso una vez que se administra a la célula.

20 En otra realización, el PEG está conjugado con un flavonoide a base de catequina oligomérico. Esta realización del agente de administración tiene fuertes propiedades de autoensamblaje y puede autoensamblarse en un proceso de una sola etapa. Al igual que con el nanocomplejo micelar de ensamblaje en dos etapas anterior, el nanocomplejo micelar de ensamblaje en una sola etapa incluye el agente anticanceroso.

25 Los nanocomplejos micelares anteriores son de dimensiones nanométricas, y pueden ser de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 10.000 nm de diámetro, o de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 4.000 nm de diámetro, o de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 100 nm de diámetro. El tamaño de los nanocomplejos micelares se puede variar variando la longitud del flavonoide a base de catequina oligomerizado, la longitud del polímero y la concentración de flavonoide a base de catequina oligomerizado no conjugado. El tamaño del nanocomplejo micelar puede depender del pH, dependiendo del polímero utilizado. Por ejemplo, en nanocomplejos micelares en los que el polímero conjugado es PEG, el diámetro de las micelas tiende a disminuir al aumentar el pH.

35 Generalmente, los nanocomplejos micelares que contienen el agente anticanceroso se someten a autoensamblaje y, por lo tanto, se requiere poca síntesis. Para el proceso de dos etapas, los componentes que van a formar el núcleo, que incluyen el agente anticanceroso, se disuelven en un disolvente adecuado, por ejemplo en DMSO diluido o metanol, y se les permite ensamblar. El disolvente es un disolvente en el que los componentes del núcleo son solubles, y que pueden ser miscibles en agua, o que pueden ser volátiles, o a partir de los cuales las micelas ensambladas pueden aislarse o extraerse de otro modo. Como se indicó anteriormente, los componentes del núcleo incluyen un agente anticanceroso y un flavonoide a base de catequina, por ejemplo un flavonoide oligomérico a base de catequina. El conjugado de flavonoide a base de catequina polimérico que forma la capa externa se añade posteriormente a la solución y se permite la formación del complejo micelar.

45 Para el proceso de autoensamblaje en una etapa, el conjugado de flavonoide a base de catequina polimérico junto con el agente anticanceroso, se disuelve en un tampón adecuado como se describe para el proceso en dos etapas y se permite el ensamblaje del nanocomplejo micelar.

50 Este sistema de nanocomplejo micelar proporciona la capacidad de lograr una biodistribución controlada de flavonoides a base de catequina y una semivida de circulación prolongada en el torrente sanguíneo debido a la capa exterior de PEG, así como actividades patológicas amplificadas del compuesto flavonoide a base de catequina, con el beneficio adicional de que tales compuestos pueden estar acompañados por el efecto terapéutico del agente anticanceroso cargado en el núcleo interno de la micela. Cuando el agente anticanceroso es una molécula sensible como una proteína, las micelas a nanoescala ofrecen un vehículo de administración conveniente con la ventaja de un método suave de autoensamblaje que no implica los esfuerzos mecánicos, térmicos y químicos que pueden asociarse con las técnicas de encapsulación convencionales actualmente utilizadas, técnicas convencionales que pueden conducir a la desnaturalización de agentes anticancerosos bioactivos sensibles tales como proteínas.

60 En otra realización divulgada en la presente memoria, el vehículo de administración es un hidrogel, que puede usarse como un apósito, para la administración de liberación sostenida de un agente anticanceroso, o como un soporte para la regeneración de tejido.

65 Se elige que el polímero tenga buenas características de capacidad de hinchamiento y que tenga grupos apropiados disponibles para la reticulación de los restos de polímero, y que sea no tóxicos y biocompatible y en algunas realizaciones sea biodegradable.

En una realización particular del hidrogel, el polímero, es ácido hialurónico derivado de aldehído, o un derivado de ácido hialurónico tal como conjugado de ácido hialurónico y aminoacetaldehído dietilacetil, o un derivado de tiramina de ácido hialurónico derivatizado con aldehído o conjugado de ácido hialurónico y aminoacetaldehído dietilacetil.

5 Los conjugados que comprenden un flavonoide a base de ácido hialurónico-catequina se pueden reticular fácilmente para formar un hidrogel, sin alteración de las propiedades biológicas o farmacológicas del flavonoide. Dichos hidrogeles también comprenden un agente anticanceroso tal como se describió anteriormente, para la liberación del agente anticanceroso a una célula en el sitio donde se aplica el hidrogel.

10 El conjugado ácido hialurónico-flavonoide se sintetiza haciendo reaccionar el ácido hialurónico con el flavonoide a base de catequina en condiciones ácidas, por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, o por ejemplo a un pH de aproximadamente 1. El polímero-flavonoide conjugado se purifica a continuación, por ejemplo mediante diálisis, y luego se mezcla con el agente anticanceroso, y un agente de reticulación, tal como peróxido de hidrógeno. Se añade un catalizador de entrecruzamiento, por ejemplo peroxidasa de rábano picante, y el hidrogel puede luego verse rápidamente en un molde para formar una forma deseada antes de que se complete la reacción de entrecruzamiento. Por ejemplo, el hidrogel puede formarse en una porción adecuada para su aplicación como apósito para heridas.

20 Los componentes del hidrogel también se pueden inyectar y hacer reaccionar para formar el hidrogel in vivo, por ejemplo inyectando un conjugado no reticulado junto con un agente anticanceroso, junto con un agente de reticulación, tal como peróxido de hidrógeno y un catalizador de reticulación, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante. Tal hidrogel es útil para la administración de fármacos a un sitio específico en un cuerpo, o para la ingeniería de tejidos.

25 Dado que el ácido hialurónico tiene múltiples sitios que pueden reaccionar con el flavonoide durante la reacción de conjugación, al variar la concentración del flavonoide a base de catequina en la reacción de partida, es posible variar el grado de conjugación entre el polímero de ácido hialurónico y el flavonoide a base de catequina. Por ejemplo, la relación entre reactivos puede ajustarse de modo que el conjugado resultante tenga de aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 % de los sitios en el polímero conjugado con el flavonoide. Como alternativa, puede añadirse ácido hialurónico adicional que no se ha conjugado con la mezcla antes de la reticulación del hidrogel de modo que algunas de las moléculas de polímero en el hidrogel no se conjuguen con el flavonoide.

35 **Administración del agente anticanceroso a una célula**

Para administrar el agente anticanceroso a una célula que usa el vehículo de administración que contiene flavonoides, el vehículo de administración que comprende el agente anticanceroso se pone en contacto con una célula, lo que puede permitir la absorción del agente anticanceroso en la célula.

40 Por lo tanto, la administración del agente anticanceroso a una célula comprende poner en contacto el vehículo de administración que contiene el agente anticanceroso con la superficie de una célula. Sin limitarse a ninguna teoría en particular, el sistema de administración se disocia por moléculas anfífilas tales como lípidos de membranas plasmáticas y, por lo tanto, el agente anticanceroso se libera en el sitio de la célula mediante selección pasiva y puede liberarse en la célula.

45 La célula a la que se enviará el agente anticanceroso puede ser cualquier célula, incluido una célula *in vitro*, una célula en cultivo, o una célula *in vivo* dentro de un sujeto. El término "célula", como se usa en la presente memoria, se refiere e incluye una sola célula, una pluralidad de células o una población de células cuando el contexto lo permite, a menos que se especifique lo contrario. La célula puede ser una célula *in vitro* que incluye una célula explantada de un sujeto o puede ser una célula *in vivo* en un sujeto. De manera similar, la referencia a "células" también incluye una referencia a una sola célula cuando el contexto lo permite, a menos que se especifique lo contrario. La administración a las células de acuerdo con la presente invención se define en las reivindicaciones 7 y 9.

55 La célula puede derivar de cualquier organismo, por ejemplo, un animal que incluye un mamífero que incluye un ser humano.

60 Cuando se administra a la célula, el agente anticanceroso conserva su función anticancerosa, como se describió anteriormente, y puede administrarse a la célula. Una persona experta puede determinar fácilmente si el agente anticanceroso se ha administrado a la célula usando métodos y técnicas conocidos, que incluyen métodos de detección de proteínas, inmunoensayos y técnicas de marcaje fluorescente.

65 Las composiciones y vehículos de administración descritos anteriormente son muy adecuados para la administración controlada y dirigida de agentes anticancerosos junto con flavonoides a base de catequinas a sitios particulares dentro del cuerpo de un sujeto. Los flavonoides pueden proporcionar actividad antibacteriana, antineoplásica, antitrombótica, vasodilatadora, antioxidante, antimutagénica, anticancerígena, hipercolesterolémica, antivírica y

antiinflamatoria en el sitio objetivo. Además, los vehículos de administración incluyen un agente anticanceroso, lo que hace que los vehículos de administración sean útiles en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, los péptidos y proteínas inmunoreguladores que incluyen citocinas y factores de crecimiento se han convertido en una clase importante de fármacos para el tratamiento del cáncer.

5 Por lo tanto, en la actualidad se divulga un método para administrar un agente anticanceroso a un sujeto que comprende administrar un vehículo de administración que comprende un conjugado de un polímero que contiene un aldehído libre y un flavonoide a base de catequina, teniendo el polímero conjugado en la posición C6 y/o C8 del anillo A del flavonoide, como se describió anteriormente. En ciertas realizaciones, el conjugado se forma en un
10 vehículo de administración, tal como un nanocomplejo micelar o un hidrogel, como se describió anteriormente. Un aspecto relacionado de la presente invención se define en la reivindicación 9.

El sujeto es cualquier animal, incluido un ser humano, que necesite tratamiento con un agente anticanceroso.

15 Por lo tanto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un vehículo de administración que contiene el agente anticanceroso y el flavonoide como se describió anteriormente. La composición farmacéutica puede incluir además un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede contener rutinariamente una concentración de sales, agentes tamponantes, conservantes y varios vehículos compatibles farmacéuticamente aceptables. Para todas las formas de administración, el vehículo de administración
20 puede formularse en una solución salina fisiológica. La reivindicación 8 define la composición farmacéutica de la presente invención.

La proporción e identidad del diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable se determina mediante la ruta de administración elegida, la compatibilidad con proteínas biológicamente activas, si corresponde, y la práctica farmacéutica estándar.

La composición farmacéutica puede prepararse por métodos conocidos para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables adecuadas para la administración a sujetos, de modo que una cantidad eficaz del vehículo de administración y cualquier sustancia o sustancias activas adicionales se combinen en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se administra una cantidad efectiva de vehículo de administración al sujeto. La expresión "cantidad efectiva" como se usa en la presente memoria significa una cantidad efectiva, a dosis y durante períodos de tiempo necesarios para lograr el resultado deseado, por ejemplo, para administrar el agente anticanceroso a la población de células o células diana dentro del sujeto, incluyendo un cantidad deseada del agente anticanceroso a la célula basado en factores que incluyen el efecto del agente anticanceroso, el efecto del flavonoide y el efecto sinérgico del agente anticanceroso y el flavonoide juntos.

Vehículos adecuados se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., EE. UU. 1985). Teniendo en cuenta esto, las composiciones incluyen, aunque no exclusivamente, soluciones del vehículo de administración, en asociación con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, y están contenidas en soluciones tampón con un pH adecuado e isoosmótico con fluidos fisiológicos.

En condiciones normales de almacenamiento y uso, tales composiciones farmacéuticas pueden contener un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos, y que mantendrán cualquier actividad biológica del agente anticanceroso. Un experto en la materia sabría cómo preparar formulaciones adecuadas. Los procedimientos e ingredientes convencionales para la selección y preparación de formulaciones adecuadas se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences y en la Farmacopea de los Estados Unidos: El Formulario Nacional (USP 24 NF19) publicado en 1999. Como alternativa, el vehículo de administración puede formularse en un tiempo suficientemente cercano para usar mezclando los componentes, sin la necesidad de conservantes. La reivindicación 9 define el uso médico del nanocomplejo micelar de la invención para administrar un agente anticanceroso a una célula en un sujeto.

El vehículo de administración divulgado en la presente memoria puede administrarse usando métodos conocidos, que dependerán de la forma del vehículo de administración. Se prefieren las rutas no orales. Si el vehículo de administración se formula como una solución, o en forma de nanopartículas micelares, el vehículo de administración puede administrarse por vía parenteral, incluyendo por vía intravenosa, intramuscular o mediante inyección directa en un tejido u órgano seleccionado. Si el vehículo de administración se formula como un hidrogel, el conjugado se puede aplicar tópicamente o mediante inserción quirúrgica en el sitio de la herida.

60 Cuando se administra a un sujeto, el vehículo de administración se administra en una cantidad efectiva y en las dosis y durante un período de tiempo suficiente para lograr un resultado deseado. Por ejemplo, el vehículo de administración se puede administrar en cantidades y dosis necesarias para administrar un agente anticanceroso que pueda funcionar para aliviar, corregir, mitigar, mejorar, estabilizar, prevenir la diseminación, ralentizar o retrasar la progresión o curar una enfermedad o trastorno, o para inhibir, reducir o alterar la actividad de una enzima relacionada con la enfermedad. Una enzima relacionada con una enfermedad es una enzima implicada en una ruta metabólica o bioquímica, que cuando la vía se interrumpe, o cuando el control regulatorio de la enzima o vía se

interrumpe o inhibe, la actividad de la enzima está implicada en el inicio o progresión de una enfermedad o trastorno, por ejemplo, cáncer.

5 La cantidad efectiva de vehículo de administración a administrar a un sujeto puede variar dependiendo de muchos factores tales como las propiedades farmacodinámicas del vehículo de administración, que incluyen el agente anticanceroso, el resto del polímero y el resto flavonoide a base de catequina, el modo de administración, la edad, la salud y el peso del sujeto, la naturaleza y el alcance del trastorno o estado de la enfermedad, la frecuencia del tratamiento y el tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, y la concentración y forma del vehículo de administración.

10 Un experto en la materia puede determinar la cantidad apropiada en base a los factores anteriores. El vehículo de administración se puede administrar inicialmente en una cantidad adecuada que se puede ajustar según sea necesario, dependiendo de la respuesta clínica del sujeto. La cantidad efectiva de vehículo de administración se puede determinar empíricamente y depende de la cantidad máxima del vehículo de administración que se puede administrar de forma segura. Sin embargo, la cantidad de vehículo de administración administrada debe ser la
15 cantidad mínima que produce el resultado deseado.

También se proporciona un vehículo de administración como se describió anteriormente que contiene el agente anticanceroso y el flavonoide.

20 También se proporciona el uso del vehículo de administración descrito anteriormente para administrar el agente anticanceroso a una célula, o el uso del vehículo de administración descrito anteriormente para la fabricación de un medicamento para administrar el agente anticanceroso a una célula, que incluye cuando la celda es una célula *in vivo* en un sujeto.

25 La invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente ejemplo no limitante.

Ejemplos

30 **Ejemplo 1: Efectos terapéuticos sinérgicos del complejo micelar cargado de proteínas compuesto por derivados del té verde**

Materiales y métodos

35 **Síntesis de OEGCG y PEG-EGCG:** El OEGCG se sintetizó mediante la reacción de Baeyer de EGCG (Kurita Ltd.) y acetaldehído (pH 2). Para sintetizar PEG-EGCG, el PEG terminado en aldehído (Pm 5000, NOF Co.) y EGCG se hicieron reaccionar a pH = 2.

40 Los complejos micelares se formaron como se describió previamente en la solicitud internacional publicada WO 2006/124000 y en la solicitud de los Estados Unidos publicada 2008/102052.

45 **Prueba de citotoxicidad:** La citotoxicidad de los derivados de EGCG se examinó con células epiteliales mamarias humanas normales (HMEC, Cambrex, EE. UU.) y se comparó con la del EGCG intacto. Las células se sembraron (1×10^4 células en medio de crecimiento epitelial mamario/ pocillo) por quintuplicado y octuplicado para muestras y control, respectivamente, en microplacas de 96 pocillos, y se dejaron adherir durante la noche. Después de que las
50 células se trataron con diferentes concentraciones de EGCG, OEGCG o PEG-EGCG durante 2 días, se estimó la viabilidad celular usando Alamar Blue, un colorante que se reduciría por la actividad del citocromo c de las células.

Evaluación de la proteólisis: La degradación proteica se determinó controlando el incremento de intensidad de fluorescencia en FITC-BSA cuando las muestras se sometieron a proteinasa K (0,05 mg/ml), usando un espectrofotómetro de fluorescencia (Hitachi, Japón, $\lambda_{ex} = 490$ nm y $\lambda_{em} = 530$ nm). Todas las mediciones se
55 realizaron por triplicado.

Evaluación de la proliferación de células cancerosas: Se sembraron células SKBR-3 (ATCC, HTB30, EE. UU.) (1×10^4 células en medio de McCoy 5A/pocillo) por quintuplicado y octuplicado para muestras y control, respectivamente, en microplacas de 96 pocillos y se dejaron adherir durante la noche. Los medios de cultivo fueron reemplazados por medios que contenían las muestras (OEGCG, PEG-EGCG, Herceptin (0,5 mg/ml), complejo micelar cargado con Herceptin y complejo micelar cargado con BSA), y las células se incubaron a 37 °C en 5 % de CO₂. En los momentos indicados, los medios de cultivo fueron reemplazados por los medios libres de rojo de fenol que contenían 10 % de Alamar Blue. La proliferación celular se determinó a partir de la reducción de la absorbancia del colorante a 570 y 600 nm después de 4 h de incubación.
60

Resultados

65 Los complejos micelares se sintetizaron mediante (i) el proceso de autoensamblaje en dos etapas que implica el ensamblaje de (-)-epigallocatequina-3-O-galato oligomérico (OEGCG), incluyendo la proteína relevante (proteína marcadora fluorescente o agente anticanceroso) cuando sea aplicable, y después el ensamblaje del complejo

OEGCG preformado (más proteína) con un conjugado de poli(etilenglicol) (PEG) y EGCG (PEG-EGCG); o (ii) un proceso de autoensamblaje en una sola etapa que implica el ensamblaje de un conjugado de PEG y OEGCG (PEG-OEGCG) (y la proteína relevante cuando sea aplicable). En ambos casos, los complejos micelares se formaron inmediatamente como complejos micelares estables y altamente orientados, cargados con la proteína relevante, mediante el autoensamblaje espontáneo en una solución acuosa suave y exhibiendo una cubierta externa de PEG con un núcleo interno compuesto de un complejo de OEGCG (más proteína).

El PEG-EGCG no mostró citotoxicidad, mientras que el OEGCG y el EGCG mostraron una baja citotoxicidad para HMEC (ver Figura 1). El complejo micelar mantuvo su integridad y demostró buena estabilidad en presencia de suero sin cambio de tamaño (ver Figura 2).

El complejo micelar se cargó con una proteína marcada con fluorescencia (FITC-BSA) y se sometió a una proteasa (proteínasa K) para investigar la degradación de la proteína a lo largo del tiempo (Figura 3). La intensidad de la fluorescencia del FITC-BSA libre aumentó significativamente con el tiempo, indicando la degradación de la proteína por la proteínasa K. Por el contrario, la intensidad de la fluorescencia de FITC-BSA cargada en los complejos micelares se mantuvo muy baja (incluso menor que la de FITC-BSA libre en la ausencia de proteínasa K), que ilustra que la proteína estaba sólidamente protegida de la proteólisis en estos sistemas.

Se exploró la inhibición del crecimiento de células cancerosas *in vitro* para el complejo micelar cargado con Herceptin (trastuzumab), que es un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor HER2/neu (erbB2) que induce la regresión de tumores de cáncer de mama metastásico que sobreexpresan HER2 (Figura 4). El complejo micelar cargado con Herceptin no mostró reducción de tamaño, se probó hasta una dilución de mil veces (Figura 5). Cuando SKBR-3 (línea celular de cáncer de mama humano que sobreexpresa HER2) se trató con Herceptin libre o los componentes del vehículo (OEGCG o PEG-EGCG), se observó que se inhibía el crecimiento celular. El complejo micelar cargado con BSA mostró más efecto de inhibición que OEGCG o PEG-EGCG solo (mientras que BSA por sí mismo no mostró ningún efecto). En particular, el complejo micelar cargado con Herceptin mostró un efecto de inhibición impresionantemente mayor, en comparación con los componentes individuales administrados (OEGCG, PEG-EGCG o Herceptin) y el complejo micelar cargado con BSA.

Dado que la formación del nanocomplejo micelar se basa principalmente en la interacción hidrófoba, el complejo se disociaría por la competencia hidrófoba de los tensioactivos. El complejo podría gradualmente disociarse y liberar componentes mediante la interacción con moléculas bioanfílicas, como los lípidos de la membrana celular, mientras que el complejo se mantendría con las células. El complejo micelar mostró un retraso de tiempo antes de exhibir el efecto terapéutico (Figura 6), es decir, no se mostró ningún efecto en puntos de tiempo tempranos (por ejemplo, a las 10 h), mientras que la proteína libre y los componentes de vehículo individuales comenzaron a ejercer efectos anticancerosos inmediatamente. Esto ilustró la ventaja estructural del complejo micelar, que se cargó con proteína dentro de una cubierta externa de PEG. Además de la liberación retardada, el complejo micelar proporcionó la liberación sostenida de las moléculas terapéuticas (proteínas y componentes vehículo) por disociación resultante de la interacción con las células. Estas características serían particularmente útiles y ventajosas a la luz del hecho de que el vehículo tendría que viajar desde el punto de administración a los sitios diana pretendidos antes de ejercer las actividades terapéuticas.

Discusión

Se ha sintetizado un vehículo nanocomplejo micelar de núcleo-cubierta con dos derivados del EGCG que se diseñaron para unirse con proteínas en una estructura ordenada espacialmente. Estos complejos formaron nanocomplejos micelares a través del autoensamblaje espontáneo en una solución acuosa (Figura 1). Los nanocomplejos micelares se obtuvieron mediante dos procesos de autoensamblaje: (i) a través de la formación de complejos entre el EGCG oligomerizado (OEGCG) y proteínas para formar el núcleo, y (ii) a través de la formación de complejos de poli(etilenglicol)-EGCG (PEG-EGCG) que rodean el núcleo preformado para formar la cubierta. El nanocomplejo micelar resultante muestra una cubierta de PEG con un núcleo de complejo OEGCG-proteína. Esta característica estructural puede servir para reducir la inmunogenicidad proteica y prevenir el rápido aclaramiento renal y la proteólisis de la proteína por la captación del sistema reticuloendotelial, disminuyendo la necesidad de inyecciones frecuentes o terapia de infusión. La cubierta altamente soluble en agua de PEG y el tamaño adaptado (<100 nm) pueden no solo prolongar la semivida en plasma, sino también proporcionar un efecto de permeabilidad y retención mejorado, dando como resultado la acumulación selectiva en tumores y sitios de infección e inflamación.

La afinidad del EGCG por la proteína se utilizó para cargar los complejos micelares con una proteína anticancerosa. Los complejos cargados de proteínas demostraron un efecto anticanceroso mucho mayor que la proteína libre o el propio vehículo. Este sistema micelar puede ofrecer una administración mejorada de diversas moléculas biológicas, a fin de explotar las ventajas de los efectos terapéuticos sinérgicos y los efectos de administración asociados con el vehículo derivado de flavonoides versátil.

Ejemplo 2: Tratamiento de ratones Balb/desnudos con complejos micelares que contienen Herceptin

Se indujeron ratones Balb/desnudos con tumores de la siguiente manera. Se administró un gránulo de 17 β -estradiol (0,72 mg, 60 días de liberación) a cada ratón mediante inyección subcutánea. Al día siguiente, una suspensión de células BT474 (8,1 X 10⁶ células/100 μ l de Matrigel) se inyectaron por vía subcutánea en cada ratón. Se permitió que los tumores se desarrollaran durante dos semanas.

Dos semanas después de la inyección de las células BT474, los ratones se trataron mediante inyección intravenosa, dos veces por semana durante un período de un mes, con uno de los nanocomplejos micelares cargados con Herceptin, Herceptin solo o PBS como control. Después del régimen de tratamiento, se evaluó el tamaño del tumor. Los resultados se muestran en la Figura 7.

Como puede comprender un experto en la materia, son posibles muchas modificaciones a las realizaciones ilustrativas descritas en la presente memoria. La invención pretende abarcar todas estas modificaciones dentro de su alcance, tal como se define en las reivindicaciones.

Aunque en la presente memoria se divulgan diversas realizaciones de la invención, se pueden realizar muchas adaptaciones y modificaciones dentro del alcance de la invención de acuerdo con el conocimiento general común de los expertos en esta técnica. Tales modificaciones incluyen la sustitución de equivalentes conocidos para cualquier aspecto de la invención con el fin de lograr el mismo resultado sustancialmente de la misma manera. Todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la materia de esta invención, a menos que se defina lo contrario

Referencias

Kataoka, K., Kwon, G. S., Yokoyama, M., Okano, T. & Sakurai, Y. Block copolymer micelles as vehicles for drug delivery. *J. Control. Release* **24**, 119-132 (1993).

Otsuka, H., Nagasaka, Y. & Kataoka, K. Pegylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 403-419 (2003).

Kakizawa, Y. & Kataoka, K. Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds. *Adv. Drug Delivery Rev.* **54**, 203-222 (2002).

Lee, E. S., Na, K. & Bae, Y. H. Polymeric micelle for tumor pH and folate-mediated targeting. *J. Control. Release* **91**, 103-113 (2003).

Farokhzad, O. C., Jon, S., Khademhosseini, A., Tran, T.-N. T., LaVan, D. A. & Langer, R. Nanoparticle-aptamer bioconjugates: A new approach for targeting prostate cancer cells. *Cancer Res.* **64**, 7668-7672 (2004).

Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M. T., Trubetskoy, V., Torchilin, V. & Langer, R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* **263**, 1600-1603 (1994).

Duncan, R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nature Rev.* **2**, 347-360 (2003). Hubbell, J. Enhancing drug function. *Science* **300**, 595-596 (2003).

Kopecek, J., Kopeckova, P., Minko, T. & Lu, Z. HEMA copolymer-anticancer drug conjugates: Design, activity, and mechanism of action. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**, 61-81 (2000).

Gordon, A. N., Fleagle, J. T., Guthrie, D., Parkin, D. E., Gore, M. E. & Lacave, A. J. Recurrent epithelial ovarian carcinoma: A randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin versus topotecan. *J. Clin. Oncol.* **19**, 3312-3322 (2001).

Cao, Y. & Cao, R. Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature* **398**, 381 (1999). Jankun, J., Selman, S. H., Swiercz, R. & Skrzypczak-Jankun, E. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature* **387**, 561 (1997).

Garbisa, S., Biggin, S., Cavallarin, N., Sartor, L., Benelli, R. & Albin, A. Tumor invasion: Molecular shears blunted by green tea. *Nature Med.* **5**, 1216 (1999).

Nance, C. L. & Shearer, W. T. Is green tea good for HIV-1 infection? *J. Allergy Clin. Immunol.* **112**, 851-853 (2003).

Tachibana, H., Koga, K., Fujimura, Y. & Yamada, K. A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nature Struct. Mol. Biol.* **11**, 380-381 (2004).

Mei, Y., Qian, F., Wei, D. & Liu, J. Reversal of cancer multidrug resistance by green tea polyphenols. *J. Pharm. Pharmacol.* **56**, 1307-1314 (2004).

Kuroda, Y. & Hara, Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutat. Res.* **436**, 69-97 (1999).

Bordoni, A., Hrelia, S., Angeloni, C., Giordano, E., Guarnieri, C., Calderera, C. M. & Biagi, P. L. Green tea protection of hypoxia/reoxygenation injury in cultured cardiac cells. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 103-111 (2002).

5

Yang, C. S. & Wang, Z.-Y. Tea and cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **85**, 1038-1049 (1993).

Kuzuhara, T., Sei, Y., Yamaguchi, K., Suganuma, M. & Fujiki, H. DNA and RNA as new binding targets of green tea catechins. *J. Biol. Chem.* **281**, 17446-17456 (2006).

10

Matsumura, Y. & Maeda, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumortropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* **46**, 6387-6392 (1986).

REIVINDICACIONES

1. Un nanocomplejo micelar que comprende:

5 un agente anticanceroso que es un anticuerpo dirigido contra un marcador de la superficie de células tumorales;
y

un conjugado de:

10 (i) polietilenglicol terminado en aldehído; y
(ii) un flavonoide que es galato de (-)-epigallocatequina monomérico o galato de (-)-epigallocatequina oligomérico,

15 teniendo el nanocomplejo micelar el polietilenglicol conjugado en la posición C6 y/o C8 del anillo A del flavonoide mediante la unión del polietilenglicol a través de la reacción del grupo aldehído libre con la posición C6 y/o C8 del anillo A del flavonoide,

20 en el que cuando el flavonoide es galato de (-)-epigallocatequina monomérico, el nanocomplejo micelar comprende además galato de (-)-epigallocatequina oligomérico no conjugado en un núcleo interno del nanocomplejo micelar, en el que el agente anticanceroso está formando un complejo con el galato de epigallocatequina oligomérico conjugado o no conjugado, dependiendo del que esté presente, y en el que el nanocomplejo micelar exhibe un efecto anticanceroso sinérgico entre el agente anticanceroso y el flavonoide cuando se administra a una célula.

25 2. El nanocomplejo micelar de la reivindicación 1, en el que el polietilenglicol está conjugado con galato de (-)-epigallocatequina oligomérico.

30 3. El nanocomplejo micelar de la reivindicación 1, en el que el polietilenglicol está conjugado con galato de (-)-epigallocatequina monomérico y el nanocomplejo micelar comprende un núcleo interno que contiene galato de (-)-epigallocatequina oligomérico no conjugado.

35 4. El nanocomplejo micelar de la reivindicación 2 o 3, en el que el galato de (-)-epigallocatequina oligomérico se forma a partir de monómeros de galato de (-)-epigallocatequina que se han oligomerizado a través de: (i) acoplamiento oxidativo catalizado por enzima; (ii) oligomerización mediada por aldehído; o (iii) un enlace carbono-carbono entre la posición C6 o C8 en el anillo A de una primera unidad monomérica y la posición C6 o C8 en el anillo A de una segunda unidad monomérica.

5. El nanocomplejo micelar de la reivindicación 1, en el que el agente anticanceroso es un anticuerpo monoclonal dirigido contra un marcador de la superficie de células tumorales.

40 6. El nanocomplejo micelar de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo monoclonal dirigido contra un marcador de la superficie de células tumorales es trastuzumab.

45 7. Un método de administración *in vitro* de un agente anticanceroso a una célula que comprende poner en contacto el nanocomplejo micelar de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 con la célula.

8. Una composición farmacéutica que comprende el nanocomplejo micelar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

50 9. El nanocomplejo micelar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en la administración de un agente anticanceroso a una célula en un sujeto.

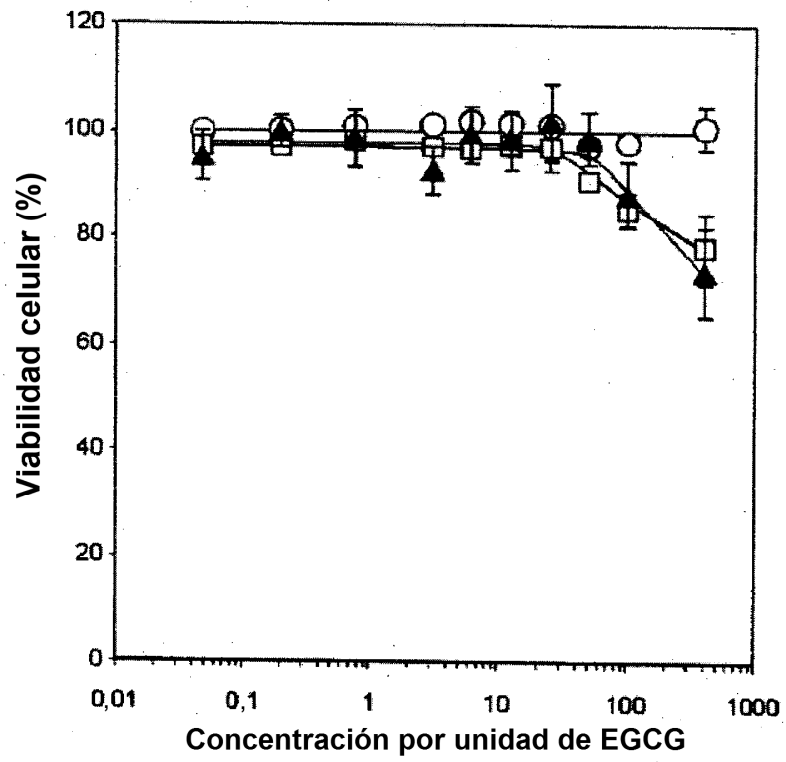


FIGURA 1

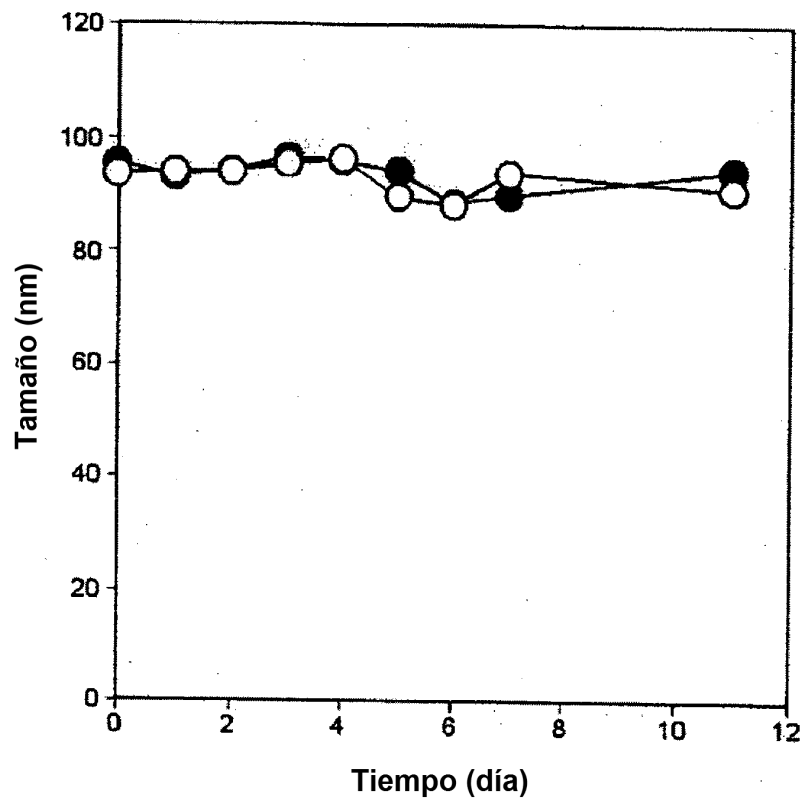


FIGURA 2

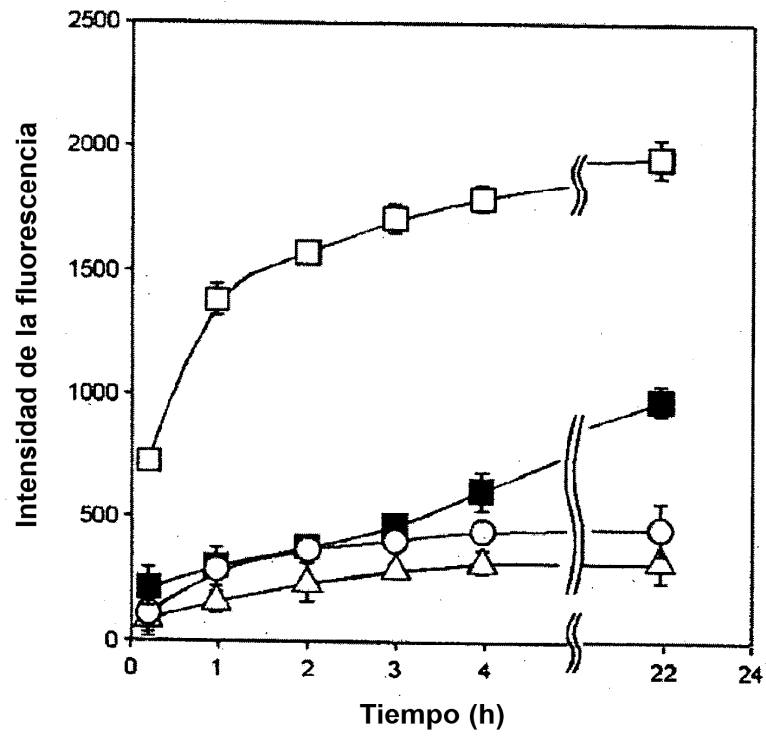


FIGURA 3

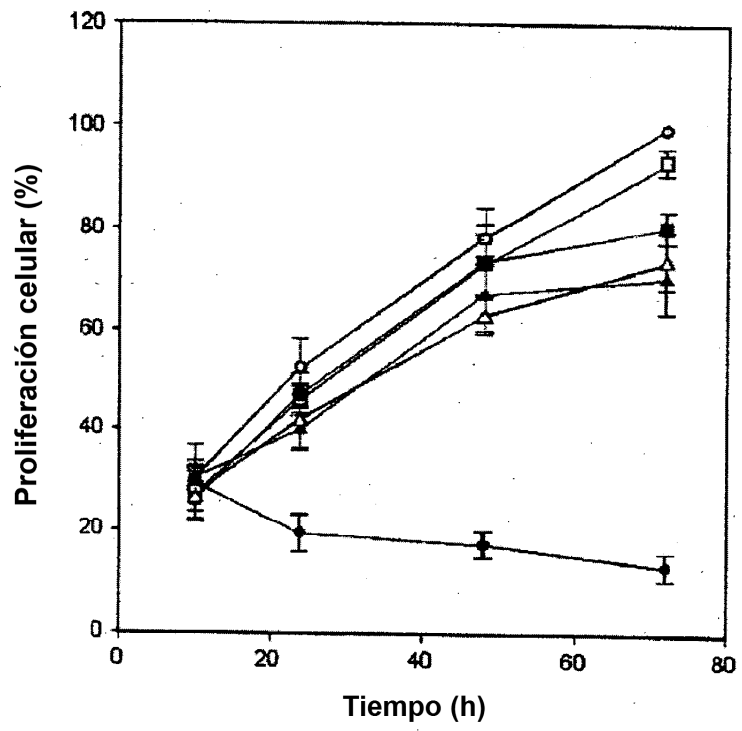


FIGURA 4

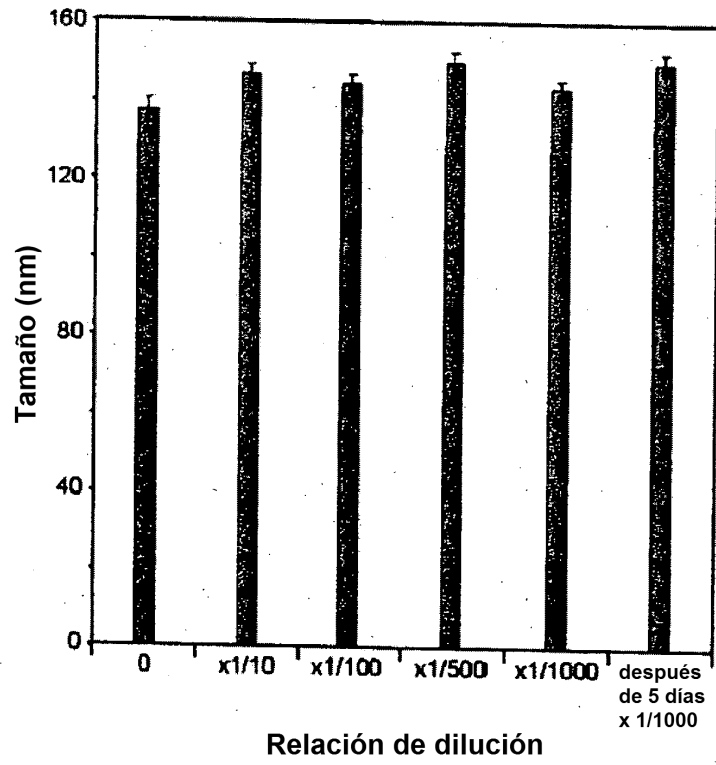


FIGURA 5

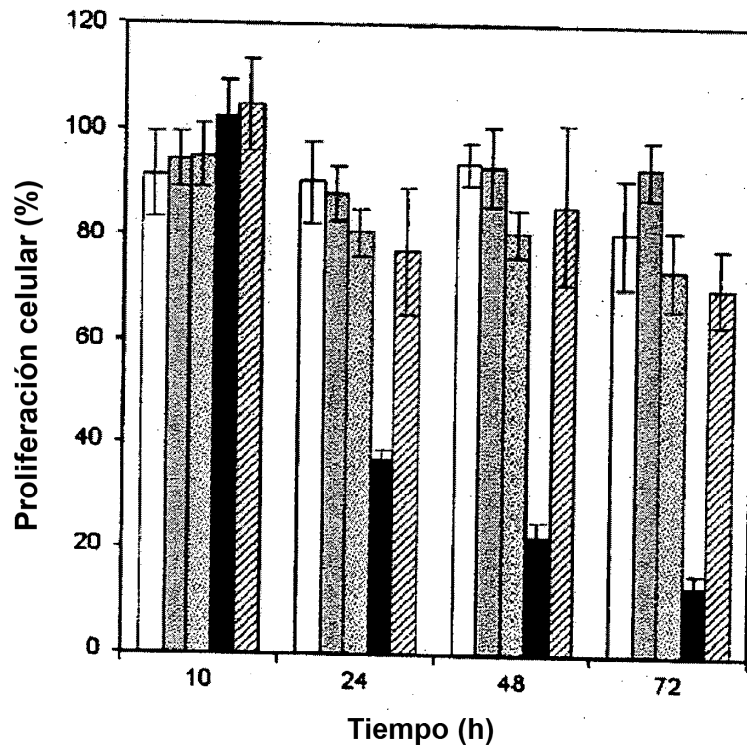


FIGURA 6

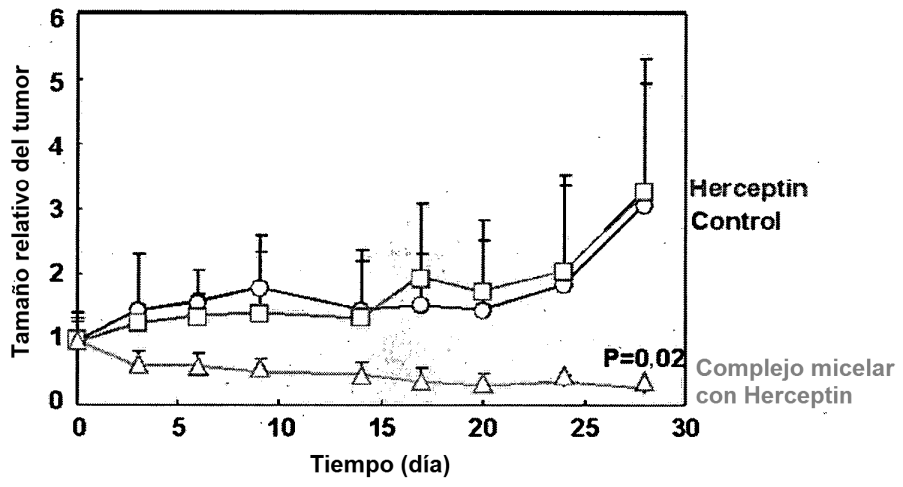


FIGURA 7