

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 463**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/60 (2007.01)
A61K 47/59 (2007.01)
A61K 9/48 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2009 PCT/US2009/040252**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2009 WO09126913**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2009 E 09730249 (1)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2271368**

54 Título: **Ácido poli(beta málico) con tripéptido colgante Leu-Leu-Leu para la administración eficaz del fármaco citoplasmático**

30 Prioridad:

11.04.2008 US 44191

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.04.2019

73 Titular/es:

**CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER (100.0%)
 8700 Beverly Boulevard
 Los Angeles, CA 90048, US**

72 Inventor/es:

**DING, HUI;
 LJUBIMOVA, JULIA Y.;
 HOLLER, EGGEHARD y
 BLACK, KEITH L.**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 710 463 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

Ácido poli(beta málico) con tripéptido colgante Leu-Leu-Leu para la administración eficaz del fármaco citoplasmático

5 Antecedentes de la invención

Los tratamientos que usan fármacos a base de ácido nucleico tales como ADN, oligonucleonucleótidos antisentido, ARN de interferencia pequeño (ARNip), microARN y/o aptámeros son atractivos pero a veces son desafiantes. Por ejemplo, los fármacos a base de ácido nucleico que se dirigen específicamente a los oncogenes tienen el potencial de bloquear las vías únicas de iniciación y propagación de las células cancerosas, pero su aplicación clínica puede verse obstaculizada debido a la falta de sistemas de administración de fármacos seguros y eficientes. Además de ser no tóxico y no inmunogénico, un sistema ideal de administración de fármacos para terapias a base de ácidos nucleicos debe ser capaz de ayudar al escape de terapias del endosoma de manera que el fármaco a base de ácidos nucleicos pueda liberarse en el citoplasma donde puede funcionar.

15 Anteriormente, se creía que la administración citoplásmica directa podía lograrse con el uso de péptidos que penetran en las células (CPP) que se translocan a través de la membrana celular, evitando así la barrera del endosoma y administrando su carga directamente al citoplasma (Elliott, G.; Cell 1997, 88, (2), 223-33.). Sin embargo, estudios adicionales revelaron que la internalización de la mayoría de los CPP implican en realidad la endocitosis (Trehin, R.; Eur J Pharm Biopharm 2004, 58, (2), 209-23). Además, la mayoría de las biomoléculas se internalizan por las células a través de endocitosis y posteriormente se canalizan a compartimentos endosómicos-lisosómicos, lo que resulta en una pérdida total de la actividad en el lisosoma si no poseen la maquinaria para escapar del endosoma. Por lo tanto, el endosoma es una barrera importante para la administración citoplásmica de terapias a base de ácido nucleico y los sistemas de administración de medicamentos deben diseñarse para desestabilizar la membrana del endosoma para ayudar al escape de los productos terapéuticos.

El documento de la patente núm.US 2007/0259008 A1 se refiere a un sistema de medicamentos, a base de ácido polimálico purificado, que es útil para administrar una carga útil de medicamentos a un tejido o tipo de célula específico.

30 Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de un sistema eficaz de administración de fármacos citoplásmicos que pueda desestabilizar la membrana del endosoma.

Breve descripción de la invención

35 El sistema de administración de fármacos de la presente invención se define en la reivindicación 1. La unidad de escape del endosoma comprende L-leucilleucilleucina (LLL). En otra modalidad, la unidad de escape del endosoma es sensible al pH. En otra modalidad, uno de los uno o más módulos moleculares biológicamente activos comprende un oligonucleótido de morfolino antisentido. En otra modalidad, uno de los uno o más módulos moleculares biológicamente activos comprende un ARNip, un microARN y/o un aptámero. En otra modalidad, uno de los uno o más módulos moleculares biológicamente activos comprende al menos un módulo de direccionamiento para promover la captación celular.

45 Otras modalidades incluyen una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, que es para su uso en un método para disminuir el volumen de un glioma en un individuo como se define en la reivindicación 13. En otra modalidad, el sistema de administración de fármacos comprende el ácido poli(β -L-málico) (PMLA) que contiene aproximadamente el 40% de un carboxilato colgante conjugado por un enlace amida. En otra modalidad, el carboxilato colgante comprende trileucina.

50 Otras modalidades incluyen un método para sintetizar un vástago de administración de fármacos de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende proporcionar una cantidad de un tripéptido Leu-Leu-Leu, proporcionar una cantidad de un ácido polimálico y conjugar el tripéptido Leu-Leu-Leu con el ácido polimálico (ver reivindicación 7). En otra modalidad, el ácido polimálico comprende PMLA. En otra modalidad, el tripéptido Leu-Leu-Leu se conjuga con el ácido polimálico mediante un enlace amida.

55 Varias modalidades incluyen además los métodos para disminuir el volumen de un glioma en un individuo, que comprenden proporcionar una composición que inhibe la síntesis de proteínas de la laminina-411, donde la composición comprende PMLA unido covalentemente a un anticuerpo dirigido, un polinucleótido antisentido de laminina $\alpha 4$ y/o el polinucleótido antisentido $\beta 1$ y un tripéptido Leu-Leu-Leu, y la administración de la composición al individuo en una concentración de hasta 1 mg/ml, pero sin excederse de ella. En otra modalidad, el polinucleótido antisentido de laminina $\alpha 4$ comprende una secuencia de polinucleótido de 5' a 3' caracterizada por la sec. con núm. de ident.: 1. En otra modalidad, el polinucleótido antisentido laminin $\beta 1$ comprende una secuencia de polinucleótido 5 a 3' caracterizada por la sec. con núm. de ident.: 2. En otra modalidad, la composición se administra sistémicamente. En otra modalidad, la composición se administra cerca del glioma. En otra modalidad preferida, el compuesto se administra mediante una inyección intratumoral. En otra modalidad, la composición se administra mediante un dispositivo implantable. En otra modalidad, la composición se administra por vía subcutánea, intraperitoneal y/o intravenosa.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, tomada en conjunto con los dibujos adjuntos, que ilustran, diversas modalidades de la invención.

5 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa un ejemplo de un portador de fármaco a base de ácido polimálico. La Figura representa una estructura esquemática de una variante mínima de policefin. Contiene tres componentes, el fármaco oligonucleótido morfolino, la unidad de escape del endosoma y un anticuerpo monoclonal dirigido. Además, otros fármacos, tales como ARNip, microARN y aptámero, pueden unirse un policefin a través de un enlace disulfuro para la administración citoplasmática.

La Figura 2 representa la estructura del ácido poli(β -L-málico), o PMLA La Figura 3 representa la estructura de PMLA-LLL. Estructura de PMLA-LLL.

La Figura 4 muestra la estructura de PMLA-(LeuOEt). Estructura de PMLA-LeuOEt.

La Figura 5 (a) y (b) representan los gráficos de los resultados para el ensayo de fuga de liposomas de diferentes conjugados de polímeros con (a) que describe resultados a un pH de 7,4 y (b) que describe los resultados a un pH de 5,0. Fuga de liposomas dependiente de la concentración por diferentes conjugados de PMLA a pH 7,4 y pH 5,0

La Figura 6 (a) y (b) representan los gráficos que demuestran el efecto de mPEG en la fuga de liposoma con (a) que describe resultados a un pH de 7,4 y (b) que describe los resultados a un pH de 5,0. Fuga de liposomas dependiente de la concentración por diferentes conjugados de PMLA con y sin mPEG a pH 7,4 y pH 5,0

La Figura 7 muestra un gráfico que muestra la diferencia de dependencia del pH entre PMLA-LLL y PMLA-LeuOEt. Fuga de liposomas dependiente del pH de PMLA-LLL40% (50 μ g/ml) (\blacklozenge) y PMLA-LeuOEt40% (50 μ g/ml) (\blacksquare).

La Figura 8 muestra un gráfico de la titulación de pKa. Estimación de los valores de pKa de PMLA (\blacktriangle), PMLA-LeuOEt (\blacklozenge), y PMLA-LLL (\blacksquare) por el método de titulación ácido-base. Solo PMLA-LLL muestra pKa de 5,5.

La Figura 9 muestra un gráfico de la viabilidad celular. Viabilidad celular de las líneas celulares de glioma U87MG y T98G después del tratamiento con PMLA-LLL o PMLA-LeuOEt

La Figura 10 representa los resultados de la transferencia de membranas mediante Western, que demuestran la administración citoplasmática de oligonucleótidos antisentido. Síntesis de las cadenas laminina-411 alfa-4 y de las cadenas beta-1 por las líneas celulares de glioma humano U87MG y T98G después del tratamiento con variantes de policefin.

La Figura 11 muestra la imagen de la acumulación mejorada de PMLA-LLL que contiene el anticuerpo del receptor de la transferrina en el tumor cerebral. Acumulación selectiva en el tumor cerebral de PMLA-LLL que contiene IgG inespecífica (control) en el panel A o anticuerpo antitransferrina (TfR mAb) en el panel B. Las intensidades de fluorescencia se muestran para el marcador conjugado en el panel C.

La Figura 12 muestra un gráfico que describe el volumen tumoral después de varios tratamientos intravenosos (mm^3 , media \pm SEM). Supresión del crecimiento del tumor cerebral humano implantado después del tratamiento con PBS (control) o diferentes variantes de policefin (prueba de Anova, $p < 0,01$).

Descripción de la invención

Singleton y otros, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3^a ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001)); Marzo, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure, 5^a ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001)); y Sambrook y Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001), proporciona a un experto en la técnica una guía general para muchos de los términos que se usan en la presente solicitud.

Un experto en la técnica reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción, los que podrían usarse en la práctica de la presente invención. Ciertamente, la presente invención no se limita de ninguna manera a los métodos y materiales descritos.

Como se usa en la presente descripción, el término "laminina-411" también significa "laminina-8."

Como se usa en la presente descripción, el término "LLL" es una abreviatura de L-Leu-(L-Leu)-(L-Leu).

Como se usa en la presente descripción, el término "PMLA" es una abreviatura de ácido poli(β -L-málico).

Como se usa en la presente descripción, el término "PMLA-LLL" incluye PMLA que contiene LLL, que está conjugado por un enlace amida que implica el N- terminal $-\text{NH}_2$.

Como se usa en la presente descripción, el término "PMLA-LLL40%" incluye PMLA que contiene 40% de carboxilatos colgantes (100%) conjugados por un enlace amida que implica el N-terminal $-\text{NH}_2$ del oligopéptido trileucina LLL.

Como se usa en la presente descripción, el término "policefin" es un nombre general para los nanoconjugados terapéuticos a base de ácido polimálico para la administración de fármacos. Puede contener componentes multifuncionales, tal como un fármaco. una porción dirigida, y una unidad de escape de endosoma.

Como se usa en la presente descripción, el término "policefin-LLL" es una variante de policefin que contiene 40% de oligopéptido trileucina LLL conjugado como se describe anteriormente.

5 Como se usa en la presente descripción, el término "policefin-LeuOEt" es una variante de policefin que contiene un 40% de éster etílico de leucina conjugado a carboxilatos colgantes (100%) por un enlace amida que involucra al grupo aminoácido éster-amino.

10 Como se describe en la presente, los inventores investigaron el PMLA natural, que es soluble en agua, no tóxico, no inmunogénico y biodegradable, por su potencial para la administración de oligonucleótidos antisentido citoplasmáticos para el tratamiento del cáncer. PMLA-LLL40% demostró actividad de fuga de liposomas sensible al pH, mientras que PMLA que contenía 10% y 25% de trileucina mostró actividad de fuga de liposoma nula o débil. Un polímero de control, PMLA que contiene 40% de éster etílico de leucina (PMLA-LeuOEt40%) mostró actividad de fuga de liposomas pero de manera independiente del pH. Además, el PMLA-LLL40% no mostró toxicidad para las líneas celulares de glioma humano U87MG y T98G a una concentración de hasta 1 mg/ml en los estudios de viabilidad celular, mientras que el PMLA-LeuOEt40% fue extremadamente tóxico a altas concentraciones. Por lo tanto, el PMLA-LLL40% se analizó para determinar la administración citoplasmática de los nucleótidos antisentido de morfolino contra las cadenas $\alpha 4$ y $\beta 1$ de la proteína laminina-411, que se sobreexpresa en gliomas y se deposita en las membranas basales de los vasos sanguíneos de tumores recién formados. El análisis de transferencia de membranas por Western mostró que PMLA-LLL que contenía nucleótidos antisentido morfolino $\alpha 4$ y $\beta 1$ inhibió notablemente la secreción de las cadenas proteicas $\alpha 4$ y $\beta 1$ de la laminina-411 de las células U87MG y T98G, lo que demuestra que esta policefina sensible al pH fue capaz de administrar y liberar con éxito los oligos antisentidos en el citoplasma.

20 Como se describe además en la presente, el policefin-LLL está diseñado para pasar a través de la barrera hematoencefálica (BBB) y contiene tres componentes clave: oligonucleótido de morfolino antisentido contra las cadenas $\alpha 4$ y $\beta 1$ de la laminina-411, el tándem dirigido a los anticuerpos del receptor antitransferrina (TfR), y nueva unidad de escape del endosoma sensible al pH, L-leucilleucilleucina (trileucina, LLL). Las variantes de policefina se inyectaron por vía intravenosa en cada grupo de ratones inoculados con células U87MG (n=8 por grupo). Después del tratamiento, el tamaño promedio del tumor de policefina-LLL y policefina-LeuOEt fue de 4 mm³, y 18 mm³, respectivamente, comparado con 47 mm³ en el grupo tratado con PBS (p <0,01). El nanoconjugado policefina-LLL, que es sensible al pH, no tóxico y biodegradable, demuestra ser el más efectivo para la administración citoplasmática de agentes anticancerígenos activos en comparación con las variantes de policefina descritas anteriormente (Lee, B.; Bioconjug Chem 2006, 17, (2), 317-26).

25 En una modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad en un individuo inyectando por vía intravenosa policefina-LLL. En una modalidad, la presente invención proporciona un método para inhibir la expresión de una proteína administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de policefina-LLL. En otra modalidad, la presente invención proporciona una molécula de administración de fármacos, que comprende un andamio molecular polimerizado de ácido carboxílico unido covalentemente a L-leucilleucilleucina. En otra modalidad, la policefina-LLL incluye oligos de morfolino antisentido, anticuerpos dirigidos y una unidad de escape del endosoma sensible al pH. En otra modalidad, la policefina-LLL contiene un 40% de oligopéptido trileucina. En otra modalidad, la enfermedad es cáncer. En otra modalidad, los oligos morfolinos antisentido incluyen el antisentido de las cadenas $\alpha 4$ y/o $\beta 1$ de la laminina-411. En otra modalidad, los anticuerpos dirigidos incluyen anticuerpos dirigidos en tándem dirigidos contra el receptor de la transferrina (TfR). En otra modalidad, la unidad de escape del endosoma sensible al pH incluye L-leucilleucilleucina (trileucina, LLL). En otra modalidad, la enfermedad se trata mediante la inhibición de la expresión de la laminina-411. En otra modalidad, la enfermedad se trata por inhibición de la angiogénesis. En otra modalidad, el individuo es un ser humano. En otra modalidad, el individuo es un ratón. En otra modalidad, la policefina-LLL consiste esencialmente en un andamio molecular de ácido carboxílico polimerizado unido covalentemente a L-leucilleucilleucina, una unidad de escape del endosoma sensible al pH, un anticuerpo dirigido y un polinucleótido de morfolino antisentido.

30 La presente invención se refiere además a un estuche para preparar una molécula de administración de fármacos, así como a la administración de un fármaco al citoplasma, y puede incluir un andamio molecular de ácido carboxílico polimerizado, un oligo de morfolino antisentido, un ARNip, un microARN, un aptámero, un anticuerpo dirigido, y L-leucilleucilleucina, y sus combinaciones. El estuche es un montaje de materiales o componentes, que incluyen al menos una de las composiciones inventivas. Por lo tanto, en algunas modalidades, el estuche contiene una composición que incluye PMLA-LLL, como se describió anteriormente.

35 La naturaleza exacta de los componentes configurados en el estuche inventivo depende de su finalidad prevista. Por ejemplo, algunas modalidades se configuran para el propósito de la administración citoplásmica de los agentes anticancerígenos activos. En una modalidad, el estuche se configura particularmente para el propósito de la administración de fármacos citoplásmicos a sujetos mamíferos, tales como, por ejemplo, sujetos humanos, animales de granja, animales domésticos y animales de laboratorio.

40 Las instrucciones para su uso pueden incluirse en el estuche. "Instrucciones para su uso" típicamente incluyen una expresión tangible que describe la técnica a emplearse en el uso de los componentes del estuche para obtener un resultado deseado, tal como preparar un nanoconjugado PMLA-LLL y administrar un fármaco al citoplasma celular.

Opcionalmente, el estuche contiene además otros componentes útiles, tales como, diluyentes, amortiguadores, portadores farmacéuticamente aceptables, jeringas, catéteres, aplicadores, herramientas de pipeteado o medición, materiales de vendaje u otra parafernalia útil que se reconocerá fácilmente por los expertos en la técnica.

5 Los materiales o componentes ensamblados en el estuche pueden proporcionarse al facultativo, almacenarse en cualquier manera conveniente y adecuada que preserve su utilidad y operabilidad. Por ejemplo, los componentes pueden estar en forma disuelta, deshidratada o liofilizada; pueden ser proporcionados a temperaturas ambiente, refrigerada o congelada. Los componentes están típicamente contenidos en material(es) de empaque adecuados. Como se emplea en la presente invención, la frase "material de empaquetamiento" se refiere a una o más estructuras
10 usadas para albergar los contenidos del estuche, tales como las composiciones inventivas y similares. El material de empaque es construido por métodos bien conocidos, preferentemente para proporcionar un ambiente estéril, libre de contaminantes. Los materiales de empaque empleados en el estuche son los utilizados habitualmente en la preparación de un nanoconjugado. Como se usa en la presente invención, el término "empaque" se refiere a una matriz sólida adecuada o a un material tales como vidrio, plástico, papel, papel de aluminio y similares, capaces de
15 albergar los componentes individuales del estuche. Así, por ejemplo, un empaque puede ser un vial de vidrio utilizado para contener cantidades adecuadas de una composición de la invención que contiene una solución de PMLA-LLL o componentes de esta. El material de empaque generalmente tiene una etiqueta externa la cual indica el contenido y/o finalidad del estuche y/o de sus componentes.

20 En diversas modalidades, la presente invención proporciona las composiciones farmacéuticas que incluyen un excipiente farmacéuticamente aceptable junto con una cantidad con eficacia terapéutica de la policefina-LLL. "Excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil para preparar una composición farmacéutica que es generalmente seguro, no tóxico, y deseable, y que incluye los excipientes que son aceptables para el uso veterinario así como para el uso farmacéutico humano. Tales excipientes pueden ser sólidos, líquidos,
25 semisólidos, o, en el caso de una composición en aerosol, gaseosos.

En diversas modalidades, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden formularse para administrarse a través de cualquier ruta de administración. "Ruta de administración" puede referirse a cualquier vía de administración conocida en la técnica, que incluye pero no se limitan a aerosol, nasal, oral, transmucosal, transdérmica o parenteral. "Parenteral" se refiere a la ruta de administración que se asocia generalmente con una inyección, que
30 incluye inyección intraorbital, infusión, intraarterial, intracapsular, intracardiaca, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal, intrauterina, intravenosa, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, transmucosal, o transtraqueal. Por la vía de la ruta parenteral, las composiciones pueden estar en la forma de soluciones o suspensiones para infusión o para inyección, o como polvos liofilizados.

35 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden contener, además, cualquier portador farmacéuticamente aceptable. "Portador farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente descripción, se refiere a un material, composición, o vehículo farmacéuticamente aceptable que se encarga de llevar o transportar un compuesto de interés a partir de un tejido, órgano, o porción del cuerpo hasta otro tejido, órgano, o porción del cuerpo. Por ejemplo, el portador puede ser un líquido o sólido de relleno, diluyente, excipiente, solvente, o material
40 encapsulante, o una combinación de estos. Cada componente del portador debe ser "farmacéuticamente aceptable" en el hecho de que debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. Este debe ser, además, adecuado para usar en contacto con cualquier tejido u órgano con el cual puede ponerse en contacto, lo que significa que no debe portar un riesgo de toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad, o cualquier otra complicación que excesivamente pese más que sus beneficios terapéuticos.

45 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden ser, además, encapsuladas, llevadas a tabletas o preparadas en una emulsión de jarabe para la administración oral. Pueden añadirse los portadores sólidos o líquidos farmacéuticamente aceptables para incrementar o estabilizar la composición, o para facilitar la preparación de la composición. Los portadores líquidos incluyen jarabes, aceite de maní, aceite de oliva, glicerina, solución salina, alcoholes y agua. Los portadores sólidos incluyen almidón, lactosa, sulfato de calcio dihidratado, terra alba, estearato de magnesio o ácido esteárico, talco, pectina, acacia, agar o gelatina. El portador puede incluir, además, un material de liberación sostenida, tal como gliceril monoestearato o gliceril diestearato, solo o con una cera.

50 Las preparaciones farmacéuticas se hacen mediante las regulaciones de las técnicas convencionales de farmacia que involucran la molienda, mezclado, granulación, y compresión, cuando son necesarias, para las formas de tabletas; o molienda, mezclado y relleno para las formas de cápsula de gelatina dura. Cuando se usa un portador líquido, la preparación estará en forma de jarabe, elixir, emulsión o una suspensión acuosa o no acuosa. Tal formulación líquida puede administrarse directamente p.o., o como relleno dentro de una cápsula de gelatina blanda.

55 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden suministrarse en una cantidad con eficacia terapéutica. La cantidad con eficacia terapéutica precisa es aquella cantidad de la composición que producirá los resultados más eficaces en términos de eficacia del tratamiento en un sujeto dado. Esta cantidad variará en dependencia de una variedad de factores, que incluyen pero no se limitan a las características del compuesto terapéutico (que incluyen actividad, farmacocinética, farmacodinamia, y biodisponibilidad), la condición fisiológica del sujeto (que incluyen edad, sexo, estadio y tipo de enfermedad, condición física general, capacidad de respuesta a una
60 65

dosis dada, y tipo de medicación), la naturaleza del portador o portadores farmacéuticamente aceptables en la formulación, y la ruta de administración. Un experto en las técnicas clínicas y farmacológicas será capaz de determinar la cantidad con eficacia terapéutica a través de la rutina de experimentación, por ejemplo, mediante el monitoreo de la respuesta del sujeto a la administración de un compuesto y el ajuste de la dosificación en consecuencia. Para una guía adicional, ver Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro ed. 20o. Edición, Williams Wilkins PA, EE.UU.) (2000).

Las dosis típicas de una administración de fármaco citoplásmico efectivo pueden estar en los intervalos recomendados por el fabricante donde se usan compuestos terapéuticos conocidos, y también según lo indicado por el experto en la técnica por las respuestas *in vitro* o respuestas en modelos animales. Tales dosis típicamente pueden reducirse hasta aproximadamente un orden de magnitud de concentración o cantidad sin perder la actividad biológica relevante. Así, la dosis real dependerá del juicio del médico, la condición del paciente, y la eficacia del método terapéutico a base de, por ejemplo, la sensibilidad *in vitro* de células primarias cultivadas o de muestras de tejido histocultivos relevantes, tales como biopsias de tumores malignos, o la respuesta observada en los modelos animales apropiados, como se describió previamente.

Como se describe en la presente, varias modalidades de la invención incluyen la administración de un fármaco al citoplasma. Como resulta evidente para un experto en la técnica, la invención puede aplicarse a cualquier número de objetivos en los que puede ser beneficioso administrar un fármaco o molécula al citoplasma y la invención no está limitada de ninguna manera a los nucleótidos que codifican las cadenas $\alpha 4$ y/o $\beta 1$ de la laminina-411. De manera similar, cualquier número de afecciones y/o enfermedades pueden tratarse de manera beneficiosa y la invención no se limita de ninguna manera al tratamiento del cáncer, la supresión de tumores y/o la inhibición de la angiogénesis por glioblastoma. Por ejemplo, varias modalidades descritas en la presente descripción pueden incluir el tratamiento del VIH y/o el SIDA, y cualquier otra cantidad de afecciones en las que sea ventajoso administrar un fármaco al citoplasma. Finalmente, como resultará fácilmente evidente para un experto en la técnica, diversas moléculas y/o fármacos pueden administrarse también al citoplasma, incluyendo la administración de proteínas, y las diversas modalidades descritas en la presente descripción no se limitan de ninguna manera a la administración del oligo morfolino antisentido y/u otros oligonucleótidos. Como se conoce por un experto en la técnica, la terapia de proteínas es frecuentemente difícil ya que la proteína es inestable o se degrada en el liposoma antes de que pueda ser efectiva, mientras que varias modalidades descritas en la presente superan estas dificultades al permitir la administración de la proteína al citoplasma.

Varias modalidades de la invención pueden ponerse también en práctica junto con un régimen de tratamiento global. Por ejemplo, como se describe en la presente, varias modalidades incluyen la administración de un fármaco al citoplasma mediante la ruptura del endosoma. Como es evidente para un experto en la técnica, los fármacos o sustancias adicionales que antes estaban inactivos en el endosoma se activarán luego de la ruptura del endosoma. Por lo tanto, varias modalidades de la invención pueden incluir fármacos o sustancias adicionales administrados al sujeto que se está tratando y la invención no solo se limita a fármacos y/o moléculas unidas covalentemente al andamio como se describe en la presente. De manera similar, como es fácilmente evidente para un experto en la técnica, pueden usarse diversas modalidades de la invención junto con o en combinación con las terapias adicionales.

Como se describe también en la presente, varias modalidades incluyen la inyección intravenosa de policefina-LLL. La inyección intravenosa proporciona numerosas ventajas sobre la mayoría de los procedimientos actuales requeridos para la administración de fármacos más allá de la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, la inyección intravenosa es un procedimiento menos invasivo que la inyección intracraneal. Sin embargo, la invención no se limita de ninguna manera a la inyección intravenosa y puede administrarse por cualquier serie de métodos. Por ejemplo, la composición puede administrarse directamente en una inyección intratumoral, o mediante un dispositivo implantable, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o cualquier otro método de administración fácilmente evidente para un experto en la técnica.

Como es evidente para un experto en la técnica, varias modalidades descritas en la presente pueden usarse también junto con la administración de ARNip, microARN y aptámeros. El PMLA-LLL puede actuar como un agente de transfección para la administración citoplasmática de ARNip, microARN y aptámeros.

Pueden usarse también eficazmente numerosas variedades de PMLA-LLL. Por ejemplo, la actividad de fuga de liposomas puede efectuarse por los niveles de pH, o modificarse debido a un mayor contenido de LLL, u otros tripéptidos, o combinación de dos o más tripéptidos, así como la longitud de la cadena lateral del péptido. Por lo tanto, como es fácilmente evidente para un experto en la técnica, la molécula de suministro de fármaco citoplásmico descrita en diversas modalidades en la presente puede modificarse en dependencia del propósito de uso deseado y las condiciones asociadas, y la invención no se limita solo a PMLA-LLL40%.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor lo reivindicado en la invención.

Ejemplo 1

General

5 El ácido poli(β -L-málico) (PMLA) de origen natural es soluble en agua, no tóxico, no inmunógeno y biodegradable. Como se describe en la presente, los inventores investigaron su potencial para su uso en la administración citoplasmática de oligonucleótidos antisentido para el tratamiento del cáncer. El PMLA que contiene el oligopéptido de trileucina al 40% (PMLA-LLL40%) demostró actividad de fuga de liposomas sensible al pH, mientras que el PMLA que contiene 10% y 25% de trileucina mostró actividad de fuga de liposomas nula o débil. Un polímero de control, PMLA que contiene 40% de éster etílico de leucina (PMLA-LeuOEt40%) mostró también actividad de fuga de liposomas pero de manera independiente del pH. Además, el PMLA-LLL40% no mostró toxicidad para las células de glioma humano U87MG y T98G a una concentración de hasta 1 mg/ml en los estudios de viabilidad celular, mientras que el PMLA-LeuOEt40% fue extremadamente tóxico a altas concentraciones. Por lo tanto, el PMLA-LLL40% se analizó para determinar la administración citoplasmática de los nucleótidos antisentido de morfolino contra las cadenas α 4 y β 1 de la proteína laminina-411, que se sobreexpresa en gliomas y se deposita en las membranas basales de los vasos sanguíneos de tumores recién formados. Mediante el análisis de transferencia de membranas por Western de policefina-LLL que contiene nucleótidos antisentido morfolino α 4 y β 1 inhibió notablemente la expresión de las cadenas proteicas α 4 y β 1 de la laminina-411 de las células U87MG, lo que demuestra que esta policefina sensible al pH fue capaz de administrar y liberar con éxito los oligos antisentidos en el citoplasma. Esta versión de la policefina (policefina-LLL) está diseñada para pasar a través de la barrera hematoencefálica (BBB) y contiene tres componentes clave: oligonucleótido de morfolino antisentido contra las cadenas α 4 y β 1 de la laminina-411, el tándem dirigido a los anticuerpos del receptor antitransferrina (TfR), y nueva unidad de escape del endosoma sensible al pH, L-leucilleucilleucina (trileucina, LLL). Las variantes de policefina se inyectaron por vía intravenosa en cada grupo de ratones inoculados con células U87MG (n=8 por grupo). Después del tratamiento, el tamaño promedio del tumor del grupo policefina-LLL40% fue de 4 mm³, en comparación con 18 mm³ en el grupo tratado con policefina-LeuOEt40% (la versión original de policefina), y 47 mm³ en el grupo tratado con PBS (p <0,01). El nanoconjugado de policefina-LLL de nuevo diseño, que es sensible al pH, no tóxico y biodegradable, demostró ser el más eficaz para la administración citoplasmática de agentes anticancerígenos activos.

Ejemplo 2

Materiales

35 Las cadenas de oligonucleótidos antisentido demorfolino-3'-NH₂ sec. con núm. de ident.: 1 para laminina α 4 (MORF-AON-1) y Sec. con núm. de ident.: 2 para laminina β 1 (MORF-AON-2) se hicieron por Gene Tools (EE. UU.). El anticuerpo monoclonal TfR antiratón de rata R17217 (mTfR) y el anticuerpo monoclonal antihumano de ratón RVS-10 (huTfR) se adquirieron de Southern Biotech (EE. UU.). El ácido poli(β -L-málico) (PMLA) (PM, 100,000; polidispersidad 1,3) se obtuvo de un caldo de cultivo de *Physarum polycephalum* y se purificó y se fraccionó por tamaños mediante cromatografía. mPEG5000-amina y maleimida-PEG3400-maleimida se obtuvieron de Luysan Bio, Inc. (EE. UU.). H-Leu-Leu-OH y H-Leu-Leu-Leu-OH se adquirieron de Bachem Americas, Inc. (EE. UU.). Las líneas celulares de glioma U87MG y T98G se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (EE. UU.).

Ejemplo 3

Síntesis de Conjugados de PMLA Trileucina PMLA-LLL40% y PMLA-LLL40%-MEA

45 A una solución de 1 ml de PMLA 73 mg (0,63 mmol equivalente a ácido málico) en acetona se le añadió una mezcla de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) y diciclohexilcarbodiimida (DCC) en 2 ml de DMF. Después de 4 horas de agitación a temperatura ambiente, la diciclohexilurea se eliminó por filtración y el volumen de la solución de reacción se redujo a aproximadamente 0,5 ml con evaporación. Posteriormente, a la mezcla de reacción se le añadió 2 ml de piridina y una solución de H-Leu-Leu-Leu-OH (90 mg, 0,25 mmol, 40% equivalente al total de grupos malilo), se disolvió con la ayuda de 24 μ l de ácido trifluoacético en DMF. Después de 2 horas de agitación a temperatura ambiente, se añadió 20 μ l de trietilamina a la mezcla de reacción. El completamiento de la conjugación se verificó con TLC con la prueba de ninhidrina. El éster *N*-hidroxisuccinimidílico sin reaccionar se hidrolizó mediante la adición de agua. El producto final PMLA-LLL40% se purificó con una columna PD-10 (GE Healthcare).

55 Para preparar PMLA-LLL40%-MEA, después de que se completó la reacción de LLL con PMLA, no se hidrolizó el éster *N*-hidroxisuccinimidílico sin reaccionar. En su lugar, se añadió clorhidrato de 2-mercaptoetilamina (7,2 mg, 0,06 mmoles, 10% equivalente a los grupos malilo totales) (MEA) y 9 μ l de trietilamina a la mezcla de reacción. La reacción terminó en 30 minutos y se verificó el completamiento de la conjugación con TLC con la prueba de la ninhidrina. Después, el éster *N*-hidroxisuccinimidílico sin reaccionar se hidrolizó mediante la adición de agua. El producto final PMLA-LLL40%-MEA se purificó con una columna PD-10 (GE Healthcare).

Ejemplo 4

65 Síntesis de policefina-LLL y policefina-LeuOEt

La conjugación de oligonucleótidos de morfolino, anticuerpos y colorante de fluorescencia a PMLA-LLL40%-MEA y PMLA-LeuOEt40%-MEA para obtener policefina-LeuOEt y policefina-LLL se describió anteriormente (Lee, B.; Bioconjug Chem 2006, 17, (2), 317-26).

5 Ejemplo 5

Ensayo de fuga de liposomas

El liposoma se preparó con el método de extrusión. Brevemente, la mezcla de PC de huevo y colesterol (relación molar, 2:1) disuelto en $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (v/v, 2:1) se secó bajo una corriente de nitrógeno. La mezcla lipídica se hidrató con amortiguador HBS (HEPES 5 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) que contiene calceína 90 mM, seguido de 19 extrusiones a través de una membrana de policarbonato de 0,1 μm con el uso de un miniextrusor (Avanti Polar Lipids). Las muestras con diluciones en serie se disolvieron en dos amortiguadores de 95 μl de pH diferente en una placa, amortiguador HEPES 137 mM pH 7,4 y amortiguador citrato 137 mM pH 5,0. Se añadió 5 μl de liposoma (concentración de lípidos 160 μM) a cada muestra y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La fuga completa de calceína se logró con la adición de una solución de Triton-X 100 al 0,25% (v/v) de los respectivos amortiguadores. La liberación de calceína se midió con fluorómetro con una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm.

20 Ejemplo 6

Estudios de citotoxicidad

Las células U87MG y T98G se sembraron en una placa de 96 pocillos (10.000 células/pocillo en 100 μl de medio) y se incubaron durante 24 h. Después, las células se incubaron con polímeros de diferentes concentraciones en 200 μl de medio durante otras 24 h. Las células viables se cuantificaron con el uso del estuche de ensayo de proliferación celular de solución acuosa CellTiter 96 (Promega) mediante la lectura de la absorbancia a 490 nm con un lector ELISA Spectra Max Plus 384.

30 Ejemplo 7

Titulación Ácido-Base

Los valores de pKa de PMLA, PMLA-LLL40% y PMLA-LeuOEt40% se estimaron con la titulación ácido-base. 16 mg de conjugados de polímero se disolvieron en 8 ml de agua desionizada y el pH de las soluciones se ajustó a un valor bajo (alrededor de 2). Las soluciones de polímeros se titularon con NaOH 0,5 N en alícuotas de 5 μl . El valor de pH de las soluciones de polímeros después de cada adición de NaOH se midió después de la mezcla cuidadosa y equilibrio suficiente.

40 Ejemplo 8

Microscopía Confocal.

Se colocaron placas U87MG en un portaobjetos Lab-Tek II de 8 pocillos que contienen 200 μl de MEM de Eagle con suero de ternera fetal al 10%, glutamina, bicarbonato de sodio, aminoácidos no esenciales, antibióticos y piruvato de sodio. Las células se incubaron con policefina-LLL-(SS-Rh) o policefina-LLL-Rh con RH (= rodamina, SS-RH = RH conjugado con disulfuro) concentración 2 μM durante 24h, 6h, 2h y 0h. Las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato modificada de Dulbecco (DPBS) por 5 veces y se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 10 minutos, seguido de lavado con DPBS tres veces. Las células se visualizaron con escáner espectral TCS SP (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania).

Ejemplo 9

Inmunoelctrotransferencia

U87MG y T98 de glioma humano producen laminina 411 secretada. Se añadió Policefina-LLL o las otras variantes a una concentración de MORF-AON 1,4 μM al medio de cultivo de estas líneas celulares cultivadas en los días 1 y 4. Para la detección de lamininas, se muestreó en el día 6 medios condicionados sin suero de sobrenadantes de cultivo por encima de un número igual de células que se habían cultivado durante el mismo período de tiempo. Las muestras se concentraron 10 veces mediante filtración a través de dispositivos de filtración Centriplus (Millipore, Bedford, MA) y las proteínas se separaron con el uso de Tris-Glicina al 8% SDS-PAGE (Invitrogen) en condiciones reductoras. Los geles se transfirieron encima de una membrana de nitrocelulosa (Invitrogen). Las membranas se sondaron con mAb seguido de detección por quimioluminiscencia con el uso del estuche Immune-Star con anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (Bio-Rad Hercules, CA). Los anticuerpos se usaron para las cadenas $\alpha 4$ [mAb 8B12] y $\beta 1$ (mAb LT3) de laminina. El anticuerpo para la repetición fibronectina humana 8^o tipo III [mAb 568] se usó para controlar la carga igual de las líneas de gel.

Ejemplo 10

Imagimática

5 Los procedimientos de imagimática para la acumulación de fármacos en tumores de ratones fueron los mismos que se informaron anteriormente.³⁰ En resumen, 5×10^4 de células de glioblastoma humano U87MG se implantaron estereotácticamente en el campo de los ganglios basales derechos de ratones atímicos (CrTac: homocigótico NCr-Foxnlnu, Taconic, EE.UU.). En el día 21 después de la implantación del tumor, se inyectó por vía intravenosa 100 μ l de las variantes de policefina marcadas con AlexaFluor 680 a la concentración de 3 μ M. Para la evaluación de la distribución del fármaco y la localización en ratones desnudos, se usó Xenogen IVIS 200 bajo anestesia con isoflurano en diferentes intervalos de tiempo (antes de la administración del fármaco; 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h después de la administración del fármaco). Veinticuatro horas después de la administración del fármaco, los ratones se sometieron a eutanasia y los fármacos circulantes en los vasos sanguíneos se eliminaron mediante perfusión intraarterial con PBS durante 20 minutos. El cerebro se extrajo para detectar la señal fluorescente. Las intensidades de la señal fluorescente en el tumor, el área adyacente del tumor, el cerebro normal y el cerebelo normal se analizaron mediante Xenogen Living Image, versión 2.50 (WaveMetrix, EE.UU.). Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos de IACUC aprobados por el comité de bienestar animal en el Centro Médico Cedars-Sinai.

Ejemplo 11

Supresión tumoral

25 Células de glioblastoma humano U87MG (5×10^4) se implantaron estereotácticamente en el campo de los ganglios basales derechos de ratones atímicos (n=8 por grupo) (CrTac: homocigótico NCr-Foxnlnu, Taconic, EE.UU.). Después del día 8, las variantes de policefina se inyectaron por vía intravenosa a dosis de 5 mg/kg de los AON a las cadenas $\alpha 4$ y $\beta 1$ de la laminina-411 cada tres días para 8 inyecciones en total. Los ratones en todos los grupos tratados con policefina y PBS se sacrificaron el día 48 después de la inoculación de las células tumorales y se midió el tamaño del tumor.

Ejemplo 12

Resultados - Síntesis de PMLA-LLL

35 La síntesis de PMLA-LLL es una conjugación simple de polimérico con péptido de trileucina. El grupo carboxilo de PMLA se activó con DCC y NHS para formar ésteres N-hidroxisuccinimídico que se sustituye con el grupo amino de la trileucina. Sin embargo, la trileucina no se disuelve fácilmente en un disolvente compatible con la reacción, como DMF y DMSO. Para resolver esto, primero se disolvió en DMF con la ayuda de 1,25 equivalentes de ácido trifluoroacético y se usó exceso de piridina como base. El total de la reacción se monitoreó con la prueba de ninhidrina. La adición de trietilamina fue para facilitar el completamiento de la reacción.

Ejemplo 13

Resultados - Ensayo de fuga de liposomas

45 Se usó el ensayo de fuga de liposomas para la actividad desestabilizadora de la membrana de varios conjugados de PMLA. Se prepararon conjugados de PMLA que contienen 10%, 25% y 40% de trileucina y se evaluó su actividad desestabilizadora de la membrana con el uso de un ensayo de fuga de liposomas. PMLA-LLL10% no mostró fuga de liposomas en las concentraciones probadas tanto a pH 7,4 como a pH 5,0. PMLA-LLL25% y PMLA-LLL40% mostraron poca actividad de fuga de liposomas, incluso a concentraciones tan altas como 2 mg/ml (menos de 10% de fuga) a pH 7,4. En contraste, PMLA-LLL40% mostró fuga significativa de liposomas a pH 5,0 desde una concentración baja (1 μ g/ml) hasta una concentración alta (2 mg/ml) y se observó fuga de liposomas de aproximadamente el 50% a una concentración de 20 μ g/ml. PMLA-LLL25% sin embargo, solo mostró actividad de fuga de liposomas a alta concentración. Por lo tanto, el contenido de LLL es importante en la modulación de la actividad liposómica de los conjugados PMLA-LLL: cuanto mayor sea el contenido de LLL, más eficiente será la fuga de liposomas. Para ver el efecto de la longitud de la cadena peptídica en la actividad de fuga de liposomas, además se analizaron los conjugados de PMLA que contienen dileucina LL40% y tetraleucina LLLL40%. Sin embargo, ninguno de los conjugados (PMLA-LL40%) y (PMLA-LLLL40%) mostró fuga significativa de liposomas tanto a pH 7,4 como a pH 5,0, lo que demuestra que la longitud de la cadena peptídica además es importante para la actividad de fuga de liposomas, con la longitud de la cadena del tripéptido óptimo para la fuga de liposomas.

65 Mientras tanto, la fuga de liposomas además se evaluó para un polímero de control PMLA-LeuOEt40%, un conjugado de PMLA que contiene 40% de éster etílico de leucina propuesto previamente para la ruptura del endosoma. A pH 5,0, PMLA-LeuOEt40% mostró un perfil de fuga de liposomas similar al de PMLA-LLL40%, pero con menos actividad de liposoma a baja concentración y con mayor actividad a alta concentración en comparación con PMLA-LLL40%. A diferencia de PMLA-LLL40%, PMLA-LeuOEt40% además mostró una buena actividad de fuga de liposomas a pH 7,4.

Consecuentemente, la actividad de fuga de liposomas de PMLA-LLL40% es sensible al pH, mientras que la de PMLA-LeuOEt40% es insensible al pH.

Por lo tanto, la sensibilidad al pH de la fuga de liposomas además se evaluó para PMLA-LLL40% y PMLA-LeuOEt40%. La actividad de fuga de liposomas de cada polímero se probó a una concentración de 50 µg/ml y a valores de pH que oscilan entre 5,0 y 7,5, representando los valores de pH que los polímeros encontrarán durante la endocitosis. El PMLA-LLL40% virtualmente no mostró actividad de fuga de liposomas a pH 7 y 7,5 y comenzó a mostrar una ligera actividad a pH 6 y 6,5. Cuando el pH es inferior a 5,5, se observó fuerte fuga de liposomas (> 60%). El PMLA-LeuOEt40% demostró una fuerte actividad de fuga de liposomas (>80%) en todos los pH probados, lo que demuestra que puede desestabilizar la membrana no solo al pH endosomal sino además al pH fisiológico. Por lo tanto, la actividad de fuga de liposomas de PMLA-LLL es sensible al pH, mientras que la de PMLA-LeuOEt es insensible al pH. La insensibilidad al pH de PMLA-LeuOEt puede causar la citotoxicidad debido a su capacidad para desestabilizar la membrana celular a pH fisiológico.

Ejemplo 14

Resultados - Efecto de mPEG en la fuga de liposomas

El polietilenglicol (PEG) se usa ampliamente para la protección de la degradación de los nanoconjugados y, anteriormente, además se usó para la protección del conjugado PMLA. Sin embargo, se desconoce cómo la PEGilación de PMLA puede afectar la actividad de desestabilización de la membrana de todo el conjugado. Es necesario resolver esto para optimizar la capacidad de administración citoplásmica del conjugado de nuevo diseño. La PEGilación prácticamente no tuvo efecto en la fuga de liposomas de PMLA-LLL40% a pH 7,4; sin embargo, a pH 5,0, se debe usar más de 10 veces de PMLA-LLL-mPEG para lograr la misma cantidad de fuga de liposomas inducida por PMLA-LLL. En contraste, la actividad liposómica de PMLA-LeuOEt se afectó por la PEGilación tanto a pH 7,4 como a pH 5,0. Además, la PEGilación de PMLA-LeuOEt tuvo un efecto más negativo en la fuga de liposomas. A ambos pH, debe usarse más de 100 veces de PMLA-LeuOEt-mPEG para lograr la misma cantidad de fuga de liposomas inducida por PMLA-LeuOEt.

Ejemplo 15

Resultados - Citotoxicidad

Para evaluar la citotoxicidad de PMLA-LLL40% y PMLA-LeuOEt40%, se trataron dos líneas celulares de glioma humano, U87MG y T98G, con cada conjugado de diferentes concentraciones. Las células viables se determinaron con el uso del estuche de ensayo de proliferación celular de solución acuosa CellTiter 96 (Promega). PMLA-LLL40% no mostró ninguna citotoxicidad hacia ambas líneas celulares en todas las concentraciones probadas hasta 1 mg/ml. Aunque el PMLA-LeuOEt40% no mostró una citotoxicidad significativa a concentraciones inferiores a 100 µg/ml, su citotoxicidad aumentó drásticamente a concentraciones superiores a 125 µg/ml para células U87MG y superiores a 500 µg/ml para células T98G. Después del tratamiento de células con polímeros (500 µg/ml) durante 24 h, las células U87MG tratadas con PMLA-LLL40% parecían saludables sin ningún cambio morfológico. En cambio, las células tratadas con PMLA-LeuOEt40% a la concentración tóxica se murieron todas y mostraron formas de células típicas de necrosis. Basado en los resultados de la citotoxicidad, el PMLA-LLL40% es más seguro que el PMLA-LeuOEt40% cuando se usa en la administración de fármacos.

Ejemplo 16

Resultados - Detección de la expresión de laminina por análisis de transferencia de membrana por Western

Se usó la transferencia de membrana por Western para confirmar que el nanoconjugado de nuevo diseño puede lograr la administración citoplásmica de oligonucleótidos antisentido. Los cultivos de las dos líneas celulares de glioma humano, U87MG y T98G se trataron con variantes de policefina. La policefina-LeuOEt y policefina-LLL son conjugados de PMLA que contienen la unidad de escape de membrana no específica LeuOEt o la unidad de escape específica de endosoma LLL y, además, los oligos de morfolino antisentido, los anticuerpos del receptor antitransferrina. La fibronectina se usó como una referencia interna para corregir la carga igual de las muestras. En ausencia de la unidad de escape del endosoma, el PMLA conjugado con solo oligo de morfolino (carril 2) o con PMLA-(TfR mAb)-AON (carril 3), no inhibió significativamente la síntesis de las cadenas $\alpha 4$ y $\beta 1$ del laminina-411 en comparación con ningún tratamiento (carril 1). Tanto la policefina-LeuOEt (carril 4) como la policefina-LLL (carril 5) inhibieron la síntesis de la laminina-411. La policefina-LLL mostró la inhibición más fuerte. La inhibición por la policefina-LLL está de acuerdo con la administración citoplásmica de oligos de morfolino. Los resultados demuestran la administración segura y eficiente de fármacos a base de ácido nucleico por policefina-LLL.

Ejemplo 17

Resultados - Acumulación selectiva de Policefina en el tumor

Para confirmar que la policefina-LLL cruzó selectivamente la barrera hematoencefálica y tumoral con el resultado de acumularse selectivamente solo en el tumor cerebral, los inventores realizaron inyecciones intravenosas en ratones desnudos con tumores cerebrales humanos y monitorearon su distribución. En estos experimentos, los inventores usaron PMLA-LLL40% conjugado con Alexa Fluor 680 que contiene el anticuerpo del receptor de la transferrina. En los experimentos de control, el anticuerpo del receptor de la transferrina se reemplazó por IgG de ratón inespecífica. Se usó el sistema de imagen Xenogen IVIS 200 para detectar la distribución del fármaco en órganos de ratón aislados y de cuerpo entero 24 h después de la inyección. Se condujeron experimentos repetidos, dando cualitativamente los mismos resultados. Como se muestra en la Figura 11, el PMLA-LLL40% que contiene el anticuerpo del receptor de la transferrina se acumuló selectivamente en el sitio del tumor y su acumulación fue significativamente mayor que la del conjugado de control que contiene la IgG no específica después de 24 (P <0,01).

Ejemplo 18

Resultados - Estudio de supresión tumoral

La laminina-411 se asocia con recurrencia de glioma y menor tiempo de supervivencia del paciente, y es importante para la angiogénesis del glioblastoma. La inhibición in vivo de la laminina-411, por lo tanto, proporciona una forma segura y efectiva de suprimir el crecimiento del tumor. Los ratones se trataron con dos variantes de policefina, policefina-LeuOEt y policefina-LLL y se sacrificaron en el día 48 después de la inoculación de células tumorales. Después del sacrificio de los ratones, se midió su tamaño tumoral. El tratamiento con la policefina-LeuOEt suprimió significativamente el crecimiento del tumor cerebral con un tamaño de tumor promedio de 18 mm³ en comparación con 47 mm³ en el grupo de control tratado con PBS (prueba de Anova de una vía, p < 0,01). Además, el tratamiento con la policefina-LLL suprimió el crecimiento del tumor en un grado aún mayor con un alto significado (tamaño promedio del tumor de 4 mm³, p < 0,001). Los resultados muestran que la policefina-LLL suministra agentes contra el cáncer no solo in vitro sino además in vivo. Debido a que este portador favorece la administración a través de endosomas, se considera un dispositivo citoplásmico seguro y eficiente para la administración de proteínas y fármacos a base de ácido nucleico.

Diversas modalidades de la invención se describen anteriormente en la Descripción de la Invención. Aunque estas descripciones describen directamente las modalidades anteriores, se entiende que los expertos en la técnica pueden concebir modificaciones y/o variaciones a las modalidades específicas mostradas y descritas en la presente descripción. Cualquiera de tales modificaciones o variaciones que caen dentro del alcance de esta descripción se incluyen también de esta manera. A menos que se indique específicamente, es la intención de los inventores que se les confiera a las palabras y frases en la descripción y reivindicaciones los significados acostumbrados y ordinarios para los expertos en la(s) técnica(s) aplicable(s).

Además, ha de entenderse que la invención se define solamente por las reivindicaciones adjuntas. Se entenderá por aquellos dentro de la técnica que, en general, los términos usados en la presente descripción, y especialmente en las reivindicaciones adjuntas (*por ejemplo*, los cuerpos de las reivindicaciones adjuntas) se deben entender generalmente como términos "abiertos" (*por ejemplo*, el término "que incluye" debe interpretarse como "que incluye pero no se limita a", el término "que tiene" debe interpretarse como "que tiene al menos", el término "incluye" debe interpretarse como "que incluye pero no se limita a," etc.). Se entenderá además por los expertos en la técnica que si se pretende un número específico de una recitación de la reivindicación introducida, tal propósito se recitará explícitamente en la reivindicación, y en ausencia de tal recitación no estará presente tal propósito. Por ejemplo, como ayuda para la comprensión, las siguientes reivindicaciones adjuntas pueden contener el uso de las frases introductorias "al menos una" y "una o más" para introducir las recitaciones de las reivindicaciones. Sin embargo, el uso de tales frases no deben construirse de manera que impliquen que la introducción de una recitación de reivindicación mediante los artículos indeterminados "un" o "una" limite cualquier reivindicación particular que contenga tal recitación de reivindicación introducida a las invenciones que contienen solamente una de tal recitación, incluso cuando la misma reivindicación incluye las frases introductorias "uno o más" o "al menos uno" y los artículos indeterminados tales como "un" o "una" (*por ejemplo*, "un" y/o "una" típicamente deben interpretarse como que significan "al menos un" o "uno o más"), y lo mismo ocurre con el uso de artículos definidos usados para introducir las recitaciones de las reivindicaciones. Además, incluso si un número específico de una recitación de la reivindicación introducida se recita explícitamente, los expertos en la materia reconocerán que tal recitación debe típicamente interpretarse como que significa al menos el número recitado (*por ejemplo*, la recitación básica de "dos recitaciones," sin otros modificadores, típicamente significa al menos dos recitaciones, o dos o más recitaciones).

ES 2 710 463 T3

Listado de secuencias

5 <110> CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER DING, Hui LJUBIMOVA, Julia Y. HOLLER, Eggehard BLACK, Keith L.

<120> ÁCIDO POLI(BETA MÁLICO) CON EL TRIPÉPTIDO COLGANTE LEU-LEU-LEU PARA LA ADMINISTRACIÓN EFICAZ DEL FÁRMACO CITOPLASMÁTICO

10 <130> 67789-1248

<160> 2

<170> versión Patent In 3.5

15 <210> 1
<211> 25
<212> ADN
<213> Homo sapiens

20 <400> 1

agctcaaagc catttctccg ctgac 25

25 <210> 2
<211> 25
<212> ADN
<213> Homo sapiens

30 <400> 2

ctagcaactg gagaagcccc atgcc 25

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 1. Una molécula de administración de fármacos que comprende un andamio molecular de ácido polimérico unido covalentemente a uno o más módulos moleculares biológicamente activos, en donde uno de los uno o más módulos moleculares biológicamente activos comprende una unidad de escape de endosoma, L-leucilleucilleucina (LLL).
- 10 2. La molécula de administración de fármacos de la reivindicación 1, en donde el andamio molecular de ácido polimérico se une covalentemente a uno o más módulos moleculares biológicamente activos por un enlace disulfuro escindible.
- 15 3. La molécula de administración de fármacos de la reivindicación 1, en donde la unidad de escape del endosoma se configura para provocar la ruptura del 60% o más de las membranas del endosoma a un pH de 5,5 o inferior.
- 20 4. La molécula de administración de fármacos de la reivindicación 1, en donde uno de los uno o más módulos moleculares biológicamente activos comprende un agente terapéutico a base de ácido nucleico.
- 25 5. La molécula de administración de fármacos de la reivindicación 1, en donde uno de los uno o más módulos moleculares biológicamente activos comprende:
(a) un oligonucleótido de morfolino antisentido; o
(b) un ARNip, un microARN y/o un aptámero.
- 30 6. La molécula de administración de fármacos de la reivindicación 1, en donde uno de los uno o más módulos moleculares biológicamente activos comprende al menos un módulo de direccionamiento para promover la absorción celular.
- 35 7. Un método para sintetizar una molécula de administración de fármacos de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende
proporcionar una cantidad de un tripéptido Leu-Leu-Leu;
proporcionar una cantidad de un ácido polimérico; y
conjuguar el tripéptido Leu-Leu-Leu con el ácido polimérico.
- 40 8. El método de la reivindicación 7, en donde el ácido polimérico comprende PMLA.
- 45 9. El método de la reivindicación 7, en donde el tripéptido Leu-Leu-Leu se conjuga con el ácido polimérico mediante un enlace amida.
- 50 10. Una composición que comprende un agente terapéutico a base de ácido nucleico unido covalentemente por enlaces disulfuro escindibles a una molécula de administración de fármaco de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en un método de administración de un agente terapéutico a base de ácido nucleico al citoplasma de una célula.
- 55 11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la célula es una célula de glioma.
- 60 12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la molécula de administración de fármaco comprende poli(ácido β -L-málico) (PMLA) que contiene aproximadamente el 40% de L-leucilleucilleucina (LLL) colgante conjugado por un enlace amida.
- 65 13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, que es para su uso en un método para disminuir el volumen de un glioma en un individuo, en donde la composición inhibe la síntesis de proteínas de Laminina-411, y en donde en la composición: el ácido polimérico comprende PMLA; el terapéutico de ácido nucleico-base comprende un polinucleótido antisentido Laminina α 4 y/o polinucleótido antisentido β 1; y el PMLA se une covalentemente a un anticuerpo dirigido, y en donde en el método la composición se administra al individuo en una concentración de hasta 1 mg/ml.
14. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 13, en donde:
(a) el polinucleótido antisentido Laminina α 4 comprende la secuencia de polinucleótido 5' a 3' descrita como la Sec. con núm. de ident.: 1; o
(b) el polinucleótido antisentido Laminina β 1 comprende la secuencia de polinucleótidos 5' a 3' descrita como la Sec. con núm. de ident.: 2.
15. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde en el método la composición se administra:

- (a) sistémicamente;
- (b) cerca del glioma;
- (c) mediante una inyección intratumoral;
- (d) mediante un dispositivo implantable del cual eluye la composición; o
- (e) por vía subcutánea, intraperitoneal y/o intravenosa.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

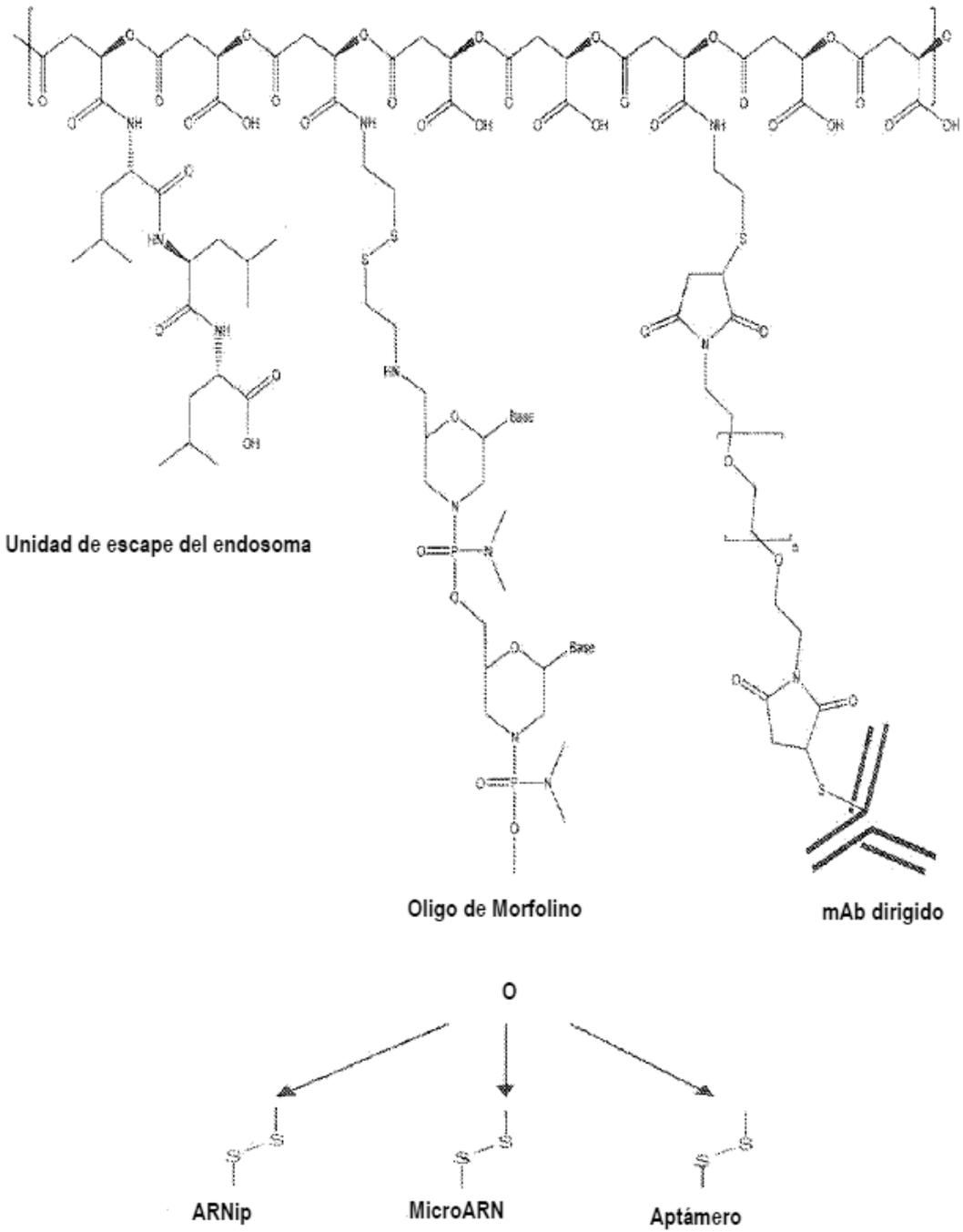


Figura 2

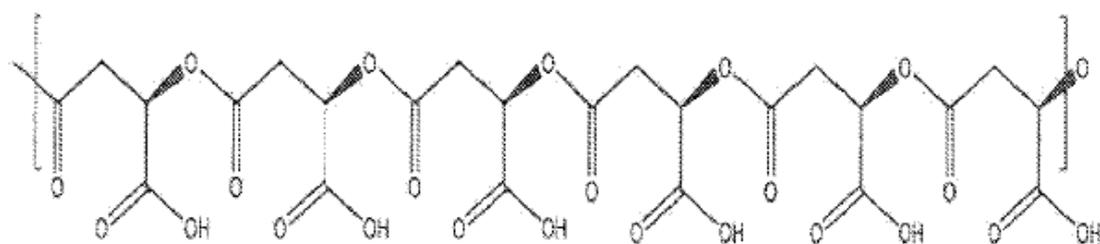


Figura 3

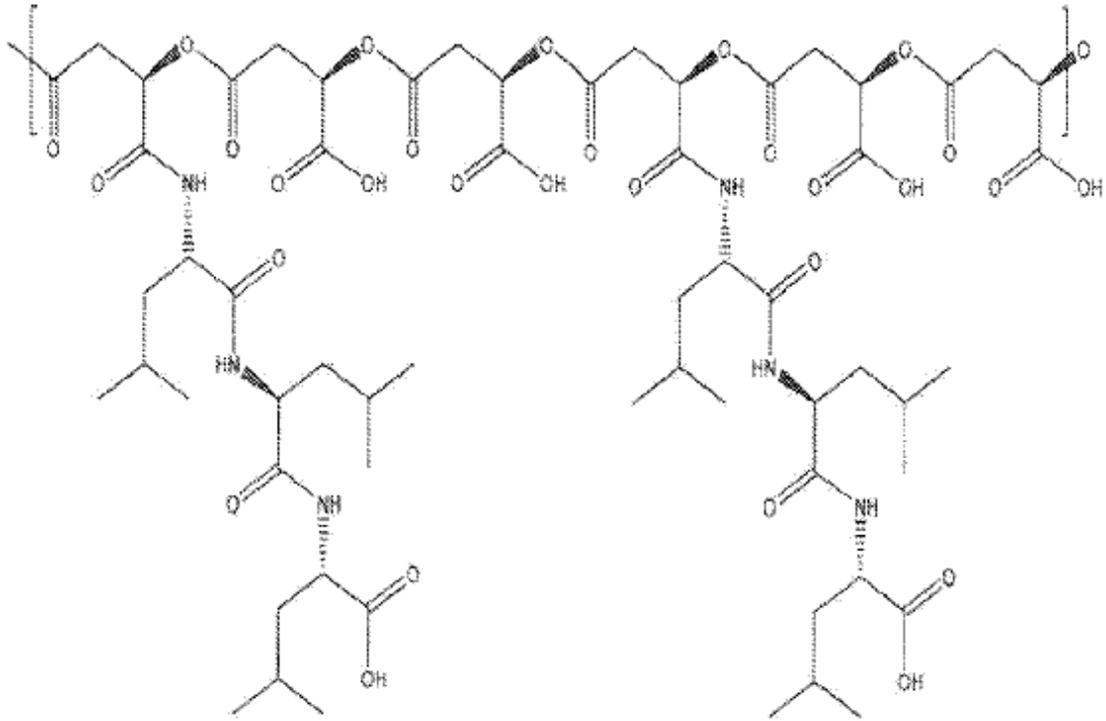


Figura 4

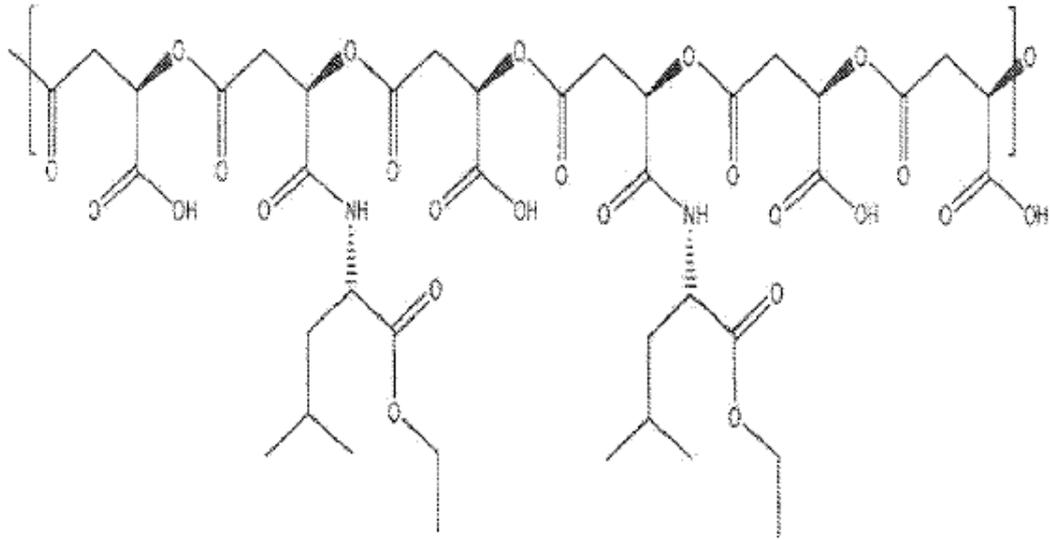
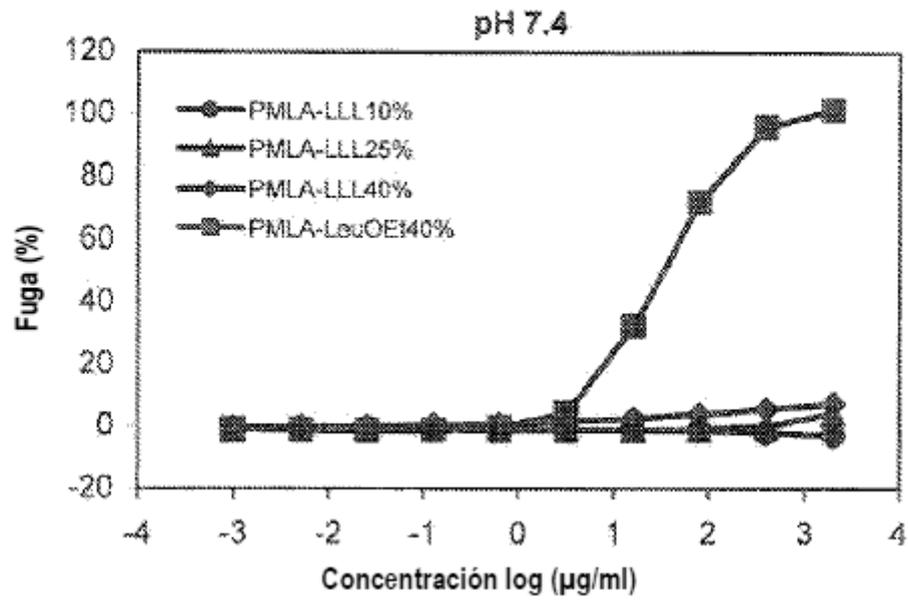


Figura 5

(a)



(b)

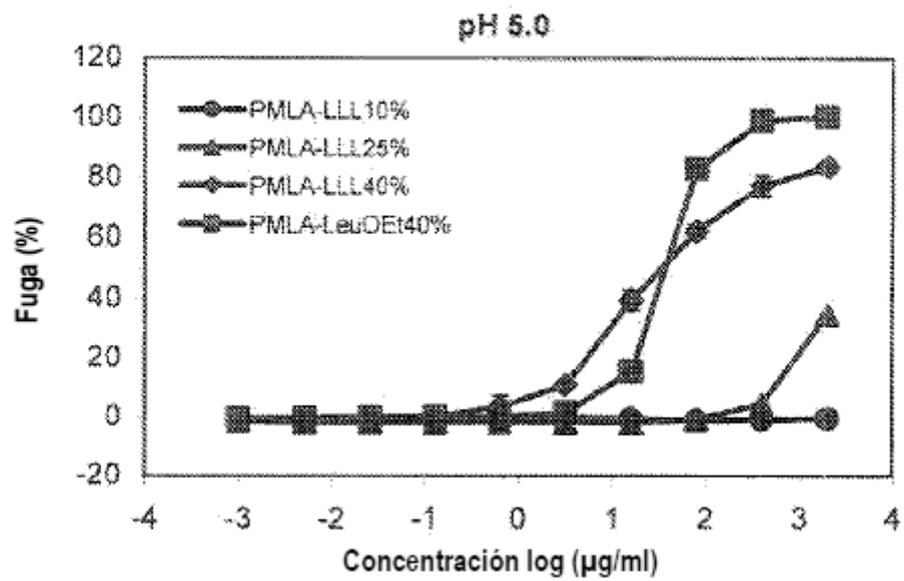
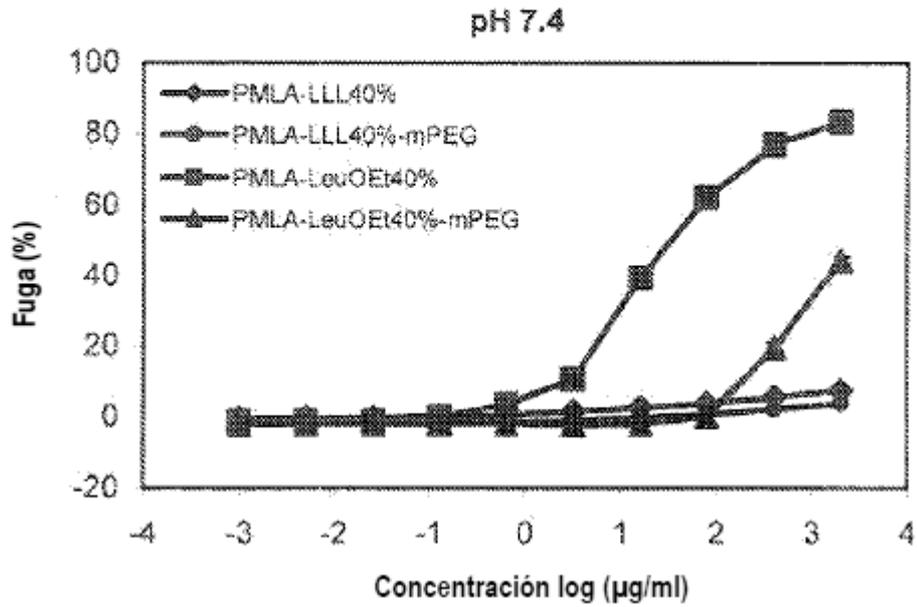


Figura 6

(a)



(b)

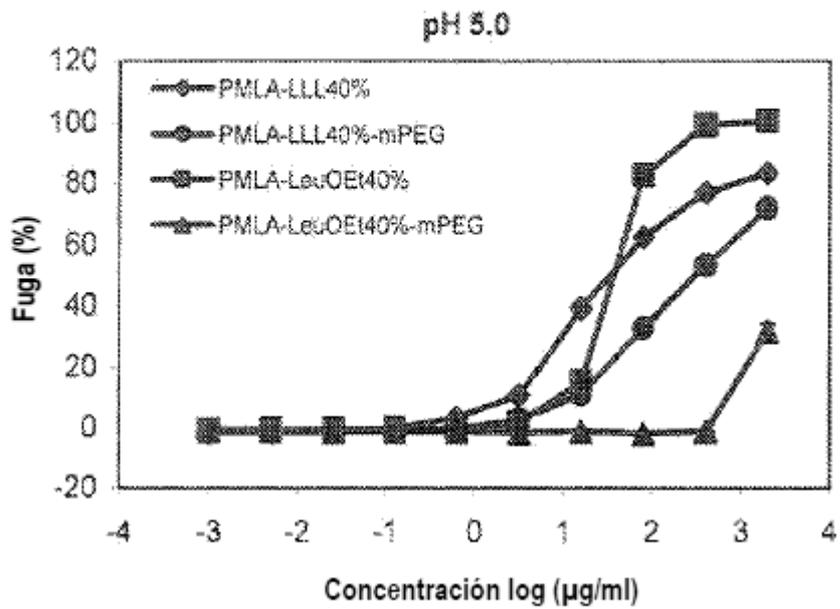


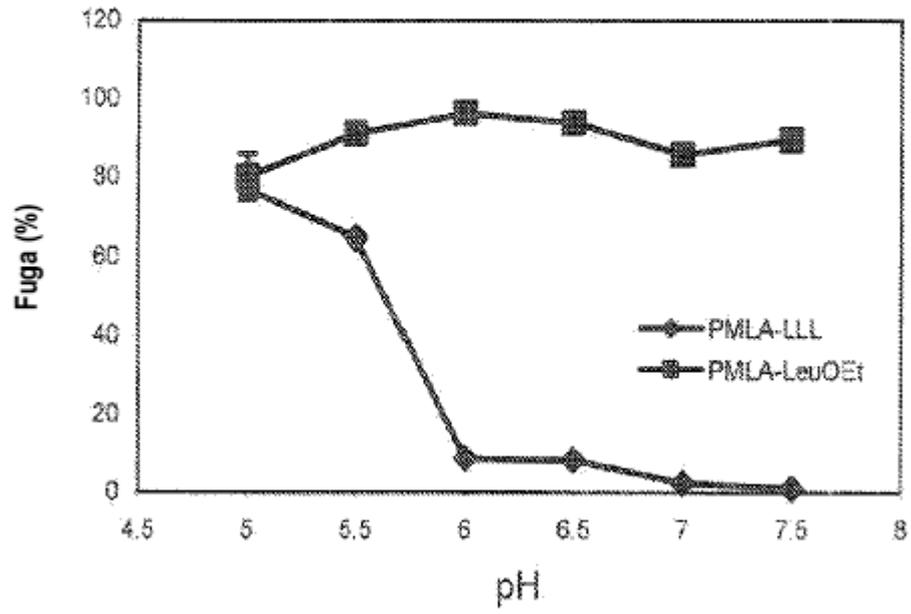
Figura 7

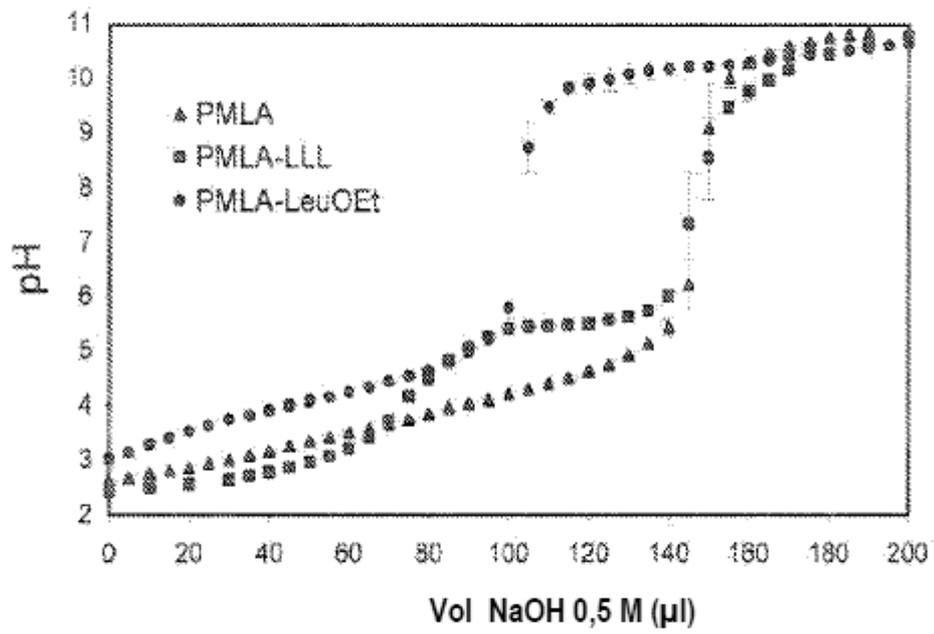
Figura 8

Figura 9

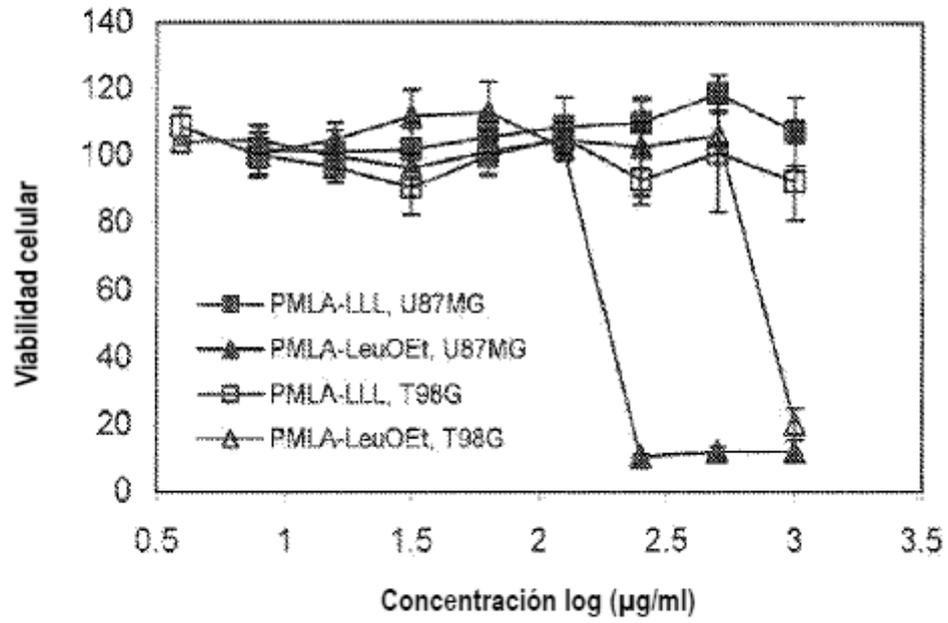
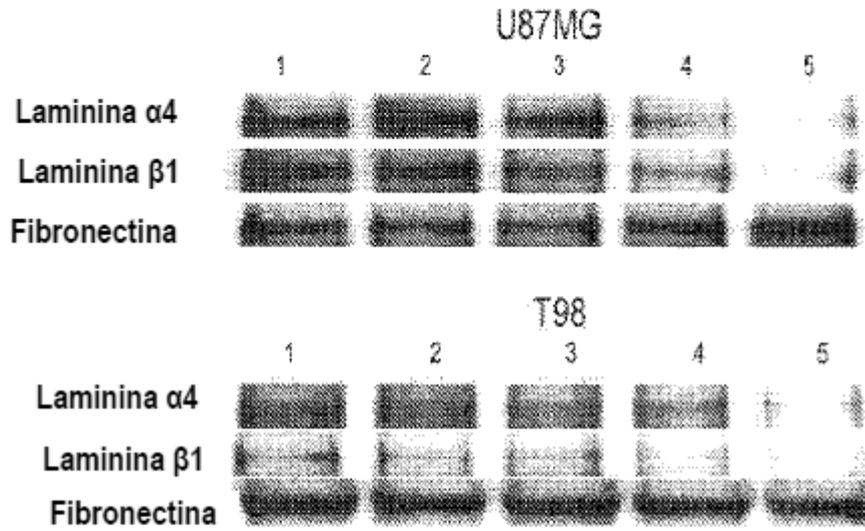


Figura 10



Línea 1: sin tratamiento
 Línea 2: solo AON
 Línea 3: PMLA-(mAb TfR)-AON
 Línea 4: policefina-LeuOEt
 Línea 5: policefina-LLL

Figura 11

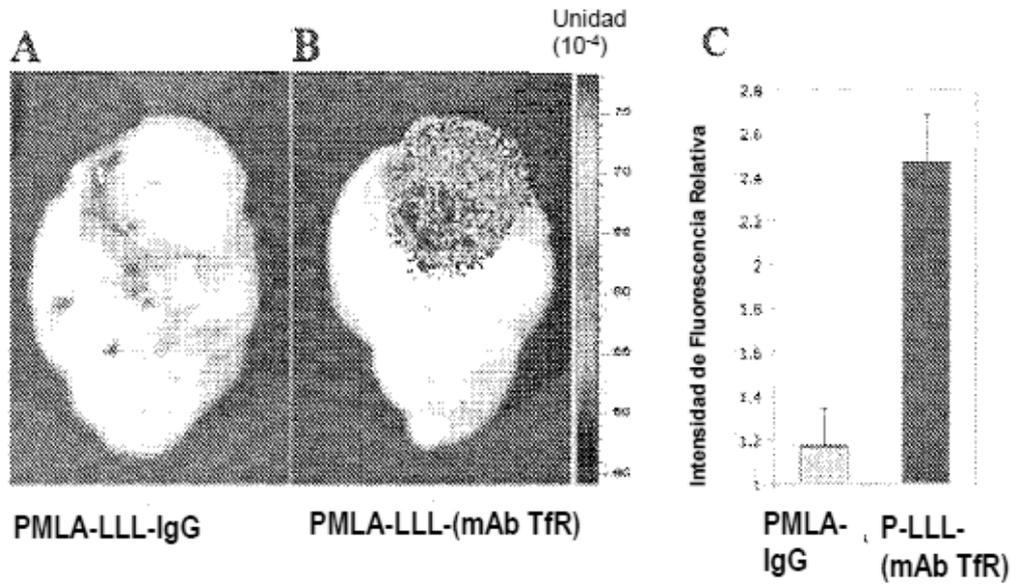


Figura 12

