

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 836**

51 Int. Cl.:

A61K 47/59 (2007.01)

A61K 47/60 (2007.01)

A61K 47/68 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2004 PCT/US2004/040660**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2005 WO05055980**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2004 E 04813049 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 1689443**

54 Título: **Sistema de administración de fármacos multifuncional a base de ácido polimérico**

30 Prioridad:

05.12.2003 US 527330 P

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

25.06.2019

73 Titular/es:

ARROGENE, INC. (50.0%)
8631 West Third Street, Suite 800E
Los Angeles, CA 90048, US y
CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER (50.0%)

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 717 836 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sistema de administración de fármacos multifuncional a base de ácido polimérico

La presente solicitud se basa en la Solicitud de la Patente Provisional de los Estados Unidos en serie No. 60/527,330 presentada el 5 de diciembre de 2003 y reivindica la prioridad de dicha solicitud.

5 Antecedentes de la invención y descripción de la técnica anterior.

La presente invención se refiere al campo de la administración dirigida de fármacos y, más específicamente, implica un vehículo de administración de fármacos dirigido multifuncional.

10 En la actualidad, se usan varios andamios moleculares diferentes en la síntesis de vehículos farmacológicos; ejemplos notables son el copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMA) (20 - 30 kDa) [42] y otros derivados del ácido poliacrílico. Sin embargo, estos no se consideran que sean biodegradables [43, y las referencias en la misma], debido a sus esqueletos de carbono-carbono, y son problemáticos debido a la inevitable contaminación por ácido acrílico peligroso [44]. Otros andamios degradables (por ejemplo, poli (ácido L-glutámico) [45] pueden tener propiedades desfavorables, como la restricción de rotación alrededor del enlace peptídico o la solubilidad limitada en solventes orgánicos deseables para la síntesis química y la purificación del producto, y, además, respalda
15 inmunogenicidad en la proximidad estructural a otras estructuras potencialmente inmunogénicas debido a la alta capacidad de formación de enlaces de hidrógeno del esqueleto peptídico [45, 46, 47].

20 Tecnología antisentido. Los oligonucleótidos (oligos) antisentido que se unen e inactivan secuencias específicas de ARN pueden ser una de las mejores herramientas para estudiar la función de los genes, la regulación de la expresión génica, las interacciones entre los productos genéticos y la validación de nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos. Los oligos antisentido ofrecen la promesa de terapias seguras y efectivas para enfermedades virales, cánceres y otras enfermedades devastadoras. Los oligos antisentido específicos que imitan la plantilla de ADN para la producción de ARN se usan para unirse al ARN complementario y para prevenir la traducción de proteínas (por ejemplo, de marcadores tumorales) [1].

25 Hay datos prometedores sobre el uso de tecnología antisentido en gliomas. El crecimiento de glioma in vitro y en ratones desnudos se puede inhibir por antisentido a la telomerasa [2]. Un estudio piloto demostró que el antisentido al receptor de IGF-I indujo la apoptosis de las células del glioma y dio lugar a mejoras clínicas de los pacientes [3]. Varios ensayos clínicos están actualmente usando oligos antisentido para el tratamiento de otros cánceres [4]. Estos estudios aprovechan oligos antisentido de nueva generación libres de especificidad, estabilidad y efectos no antisentido insuficientes [5]. Las variedades más prometedoras de oligos mejorados son oligos de morfolino y oligos
30 de ácido nucleico peptídico (PNA). Estas variedades tienen la mayor especificidad de secuencia de todos los tipos de antisentido, y mantienen esta especificidad en un amplio intervalo de concentración [6, 7, 8, 9, 10 y 11]. Una nueva variante del enfoque antisentido en rápida evolución está representada por pequeños ARN interferentes (ARNip) que también son silenciadores de la expresión de genes muy potentes y posibles fármacos anticancerosos.

35 El bloqueo combinado de varios marcadores moleculares in vitro e in vivo para prevenir la progresión del tumor. Este enfoque se ha usado con éxito en la quimioterapia contra el cáncer, pero aún no se ha aplicado a los marcadores tumorales específicos dirigidos. Solo siguiendo el desarrollo de los enfoques de la matriz de genes/proteínas, fue posible obtener y correlacionar datos sobre cambios concertados de genes específicos durante la progresión y recurrencia del tumor. Tales cambios concertados ofrecen la posibilidad de contrarrestar las alteraciones simultáneas de varios genes con la esperanza de bloquear eficazmente el desarrollo y la progresión del tumor.
40 Existen varios genes candidatos para bloquear el crecimiento y la diseminación del glioma, incluidos los receptores de tirosina quinasa (por ejemplo, EGFR), algunos factores de crecimiento y genes antiapoptóticos que se pueden usar potencialmente en combinación con agentes quimioterapéuticos para prevenir más eficazmente el crecimiento de tumores [12, 13, 14, 15 y 16]. Nuestros estudios anteriores identificaron otra proteína candidata potencial, la laminina 8, que se sobreexpresa en tumores cerebrales y mamarios, se correlaciona con un mal pronóstico de los
45 gliomas y está implicada en la invasión del glioma.

Administración de fármacos. Para dirigirse directamente a las células cancerosas para tratar tumores, los fármacos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, oligos antisentido o moléculas pequeñas (tal como Tarceva (erlotinib)), deben poder penetrar la membrana celular. Existen tres métodos básicos para la administración intracelular de fármacos, la difusión pasiva a través de canales o poros acuosos en la membrana, la difusión pasiva de los fármacos solubles en lípidos mediante la disolución en los lípidos de la membrana y el transporte activo mediado por portadores (vectores virales, sistema de transferencia de genes mediado por liposomas, productos químicos especiales) [16, 17]. El tejido cerebral es especialmente difícil de tratar con fármacos porque tiene una barrera hematoencefálica especial con uniones estrechas entre las células endoteliales microvasculares del cerebro que impiden la penetración de fármacos solubles en agua e ionizados o polares [18, 19].

55 Las moléculas de alto peso molecular han recibido recientemente una atención especial debido al aumento del efecto de la permeabilidad y retención (EPR) observado en el tejido canceroso para macromoléculas y lípidos (PM > 45 kDa) [20, 21 y 22]. A diferencia de los fármacos anticancerosos de molécula pequeña que se usan en la

actualidad, que no distinguen el tumor del tejido normal, los fármacos macromoleculares (o polímeros) pueden dirigir tumores con alta selectividad a través del efecto EPR [22, 23]. Uno de estos prometedores portadores de fármacos, el ácido poli-L-málico (PMLA), ha sido desarrollado por uno de los presentes inventores [24, 25]. Ljubimova et al., "A new multifunctional drug delivery system based on polymeric acid to inhibit angiogenesis and invasion of human gliomas in vitro and in vivo" European Journal of cancer. Supplement, Pergamon, Oxford, GB vol. 2, no. 8, de septiembre de 2004 (2004-09), página 184, se publicó después de la fecha de prioridad reivindicada y antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Ljubimova et al. describe una construcción de administración de fármacos multifuncional que consiste en módulos unidos al ácido polimálico (PMLA) de *Physarum polycephalum*. Los módulos son (1) oligonucleótidos antisentido morfolino que se escinden en el citoplasma para liberar el fármaco libre, (2) anticuerpo para el receptor de la transferrina para la selección de células cancerosas y endocitosis mediada por receptor, (3) L-leucina conjugada con PEG de cadena corta y L-valina acoplada directamente, para proporcionar lipofilia dependiente del pH para romper las membranas del endosoma, (4) PEG de cadena larga para protección, (5) indicador fluorescente (fluoresceína o Cy5) para detectar la construcción en tejido/célula.

Resumen de la invención

El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones. Un objeto de la invención es resolver los problemas que han plagado previamente sistemas portadores de fármacos usando ácido polimálico, que contiene una gran cantidad de grupos carboxílicos funcionales, al menos aproximadamente 50 de tales grupos y aproximadamente 500 por molécula de ácido polimálico de masa 50,000. El ácido polimálico está fácilmente disponible en un intervalo de tamaños desde una masa molecular de 2,500 hasta al menos 100,000. Esto permite la unión de un gran número de módulos moleculares funcionales biológicos activos para lograr:

- una alta variabilidad en el tipo y número de moléculas dirigidas a los tejidos por molécula portadora del fármaco;
- una alta variabilidad en el tipo y número de moléculas de fármaco conjugado (profármacos) por molécula portadora del fármaco;
- una capacidad de controlar la solubilidad al tener grupos que portan ya sea residuos hidrófobos o hidrófilos además de los módulos funcionales;
- una capacidad para conjugar, aparte de los módulos funcionales descritos, grupos adicionales, tal como PEG, que son activos en la protección del sistema portador contra la degradación, por ejemplo, para aumentar la vida útil en el sistema de circulación sanguínea;
- un andamio portador que es biodegradable, junto con muchos otros residuos usados como unidades de construcción del sistema de administración de fármacos;
- un sistema sin uso de componentes virales;
- un sistema de administración con módulos funcionales (mAB u otros ligandos del receptor de la superficie de la célula tumoral), el tipo de fármaco (oligonucleótidos antisentido para genes expresados de manera maligna), y una masa molecular totalmente alta del sistema de administración de fármacos cuenta con una alta especificidad hacia el tejido tumoral (efecto de EPR); y
- un sistema farmacológico de baja toxicidad que permite dosis de rata tan altas como 5 mg/kg de peso corporal de rata.

Un objeto adicional de la invención es:

- facilitar la síntesis de un sistema de administración de fármacos evitando los métodos sintéticos complicados y las reacciones secundarias incontrolables;
- construir solubilidad favorable y otras propiedades que proporcionen una purificación fácil;
- lograr los máximos rendimientos que permitan una estequiometría definida y la reproducibilidad de cada reacción química de conjugación individual;
- sentar los fundamentos estructurales y sintéticos para una alta variabilidad con respecto al tipo y número de módulos funcionales conjugados; y
- proporcionar una tecnología que permita una ampliación simple del sistema de administración de fármacos.

La invención técnica incluye:

- la elección del sistema de administración de fármacos que emplea ácido polimálico como un esqueleto o andamio que porta un número muy alto de grupos carboxílicos reactivos (aproximadamente 500 para un andamio de masa molecular 50,000);

- activación de la mayoría (idealmente todos) de estos grupos carboxílicos formando sus ésteres de NHS;
 - preparación químicamente independiente de módulos funcionales, que portan grupos amino individuales como nucleófilos para la sustitución en los grupos carboxilo activados por NHS;
 - preparar el andamio activado y cada uno de los módulos funcionales reactivos por separado;
- 5
- combinando y haciendo reaccionar el andamio activado por NHS y cada módulo funcional reactivo independiente pero en un orden secuencial bien definido, permitiendo la purificación y verificación de los intermedios/productos deseados después de cada adición de un módulo funcional recién agregado;
 - combinando estos reactivos en cantidades estequiométricas;
 - lograr altos y reproducibles rendimientos del conjugados; y
- 10
- evitar reacciones secundarias de los módulos funcionales reactivos recién añadidos con los módulos ya conjugados al elegir una jerarquía bien organizada de adiciones secuenciales para la conjugación de los siguientes módulos funcionales entrantes.

15 Se describe el diseño y la síntesis de un portador o andamio, que transporta un fármaco conjugado covalentemente a un tejido diana, se une a los receptores de la superficie celular del tejido, se interioriza en los endosomas, escapa de los endosomas al citoplasma y fármaco libre de reactivo en el citoplasma por reacción química con glutatión y otros grupos sulfhidrilo del contenido citoplásmico. La especificidad de los vehículos farmacológicos de alta masa molecular o incluso de las partículas se basa tanto en la orientación del tejido tumoral por medio de moléculas dirigidas conjugadas específicas del tumor como en su permeabilidad y retención mejorada en tumores (efecto EPR) que se origina únicamente a partir de su alta masa molecular (> 20000) [40,41].

20 El andamio poli (ácido málico) (PMLAH) usado en la presente solicitud de patente contiene un enlace éster de cadena principal, es biodegradable [27, y las referencias en la misma] y de alta flexibilidad molecular [49], soluble en agua (cuando se ioniza) y solventes orgánicos (en su forma ácida), no tóxicos y no inmunogénicos [27, y las referencias en la misma]. El fármaco que porta PMLAH ha sido sintetizado principalmente por polimerización de apertura de anillo de lactonas de ácido málico derivadas [27, y las referencias en la misma]. La síntesis de doxorubicin-poli (ácido málico) se ha descrito a partir de poli (ácido β -D, L-málico sintetizado químicamente) [49]. La síntesis de vehículo del fármaco a partir de PMLAH de origen natural no se ha llevado a cabo. El tipo de sistema de administración de fármacos altamente funcional descrito en la presente solicitud de patente no se ha descrito previamente.

30 El portador consiste en poli (ácido β -L-málico) (PMLA) que representa el esqueleto o andamio molecular que está conjugado químicamente en sus grupos carboxílicos en proporciones definidas con una variedad de módulos funcionales que realizan las siguientes tareas: (1) entrega de un profármaco a través de un módulo funcional liberable que se hace efectivo en el citoplasma, (2) dirigiendo el portador hacia un tejido específico mediante la unión a las superficies de las células (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal (mAB)), (3) interiorización en la célula diana a través de endosomas (generalmente a través de la interiorización de un receptor de superficie dirigido), (4) escapan de los endosomas al citoplasma en virtud de unidades funcionales hidrofóbicas que se integran y finalmente rompen las membranas endosómicas, y se vuelven efectivas durante la acidificación de los endosomas en el camino hacia lisosomas, (5) protección por polietilenglicol (PEG) contra actividades enzimáticas degradantes (por ejemplo, peptidasas, proteasas, etc.).

40 En esta invención, un "módulo" es una estructura molecular biológicamente activa como se define en las reivindicaciones, que va desde una molécula de fármaco pequeña o una molécula de cromóforo hasta un anticuerpo completo. En el caso de los ejemplos presentados en este documento (1) está representado por oligonucleótidos antisentido morfolino contra la cadena α -4 y la cadena β -1 de laminina-8 [34, 51] acoplado a un espaciador que interviene por un enlace amida por medio de un grupo $-NH_2$ (amino) introducido artificialmente en sus extremos 3'. El espaciador está unido al portador por una unidad estructural disulfuro que se puede escindir en la reacción de intercambio sulfhidrilo-disulfuro con glutatión en el medio reductor del citoplasma [51, 52]. (2) El direccionamiento del tejido se diseña empleando un anticuerpo monoclonal (mAB) para reconocer y unirse al receptor de la transferrina de rata. Este receptor se ha encontrado expresado en las superficies de las células endoteliales que funcionan como la barrera hematoencefálica (BBB) y en niveles elevados en ciertos tumores [53, 54]. Los estudios in vitro e in vivo indican que el receptor de la transferrina se puede usar como un anclaje para un sistema de administración de fármacos unido químicamente a la transferrina o mAB OX-26 o cualquier otro mAB apropiado que se una al receptor de la transferrina y, por consiguiente, logre la transcitosis a través de la barrera hematoencefálica (BBB) de rata o ratón u otros mamíferos dependiendo del alotipo del anticuerpo [5, 56, 57; 45, 58, 59, 60 y 61]. (3) Se ha demostrado la unión del anticuerpo al receptor de la transferrina y la interiorización en endosomas [57, 55 y 57]. Se apreciará que en el caso del receptor de la transferrina cualquier anticuerpo apropiado, mAB, anticuerpo humanizado o quimérico específico para el receptor de la transferrina se puede usar. (4) Se ha demostrado que el escape endosomal funciona para los derivados del ácido poliacrílico por acidificación durante la maduración de las vesículas endosómicas hacia los lisosomas [51, 62]. El portador diseñado propuesto en esta solicitud de patente porta una

- gran cantidad de residuos de valina unidos al andamio de ácido polimérico por enlaces amida. Durante la acidificación de los endosomas en camino a los lisosomas, estos tramos de la molécula portadora se vuelven neutralizados por el cambio e hidrófobos, y son capaces de romper las membranas. Las moléculas de leucina se pueden usar en lugar de la valina siempre que se neutralicen con la carga a pH lisomal. (5) La PEGilación aumenta notablemente la vida media de las proteínas conjugadas [63], prolonga el tiempo de circulación y aumenta la extravasación en tumores sólidos dirigidos [64].
- 5
- Descripción de las figuras
- La figura 1a muestra la estructura global de una molécula de fármaco de la presente invención.
- La figura 1b muestra la secuencia general de etapas usadas para ensamblar la estructura de la figura 1a.
- 10 La figura 2 es un diagrama que ilustra la síntesis del éster de PMLA-NHS,
- La figura 3 es un diagrama que ilustra la síntesis de oligonucleótidos antisentido (morfolino- PDP);
- La figura 4 es un diagrama que ilustra la síntesis de N-fluorescein-5'-tiocarbamoil) diaminohexano;
- La figura 5 es un diagrama que ilustra la síntesis de N, N-bis- (3-maleimidopropionil)poli(etilenglicol);
- 15 La figura 6 es un diagrama que ilustra la síntesis del conjugado PMLA/L-valina/2-mercaptoetilamina/mPEG5000-NH₂.
- La figura 7 es un diagrama que ilustra la síntesis del conjugado PMLA/mAB OX-26/oligonucleótido antisentido morfolino/L-valina/2-mercaptoetilamina/mPEG5000-NH₂.
- La figura 8 es un diagrama que ilustra la conjugación de FITC con el conjugado PMLA/mAB OX-26/oligonucleótido antisentido morfolino/L-valina/2-mercaptoetilamina/mPEG-NH₂;
- 20 La figura 9 muestra un gráfico de barras de los resultados de un ensayo hemolítico usado en la prueba de los polímeros.
- La figura 10a muestra la liberación de oligos de morfolino del portador por medio de la reducción con glutatión.
- La figura 10b muestra el porcentaje de liberación de oligo en el tiempo en respuesta a la reducción con glutatión.
- 25 La figura 11 muestra una curva de supervivencia de Kaplan-Meier de ratas después de los tratamientos con el fármaco 2 en comparación con el fármaco 2A y/o PBS (simulado) según se analizó mediante una prueba de log-rango con una significación de $p < 0.01$;
- La figura 12 es la distribución conjunta del marcador endosomal FM 4-64 con el fármaco 2 (30 min) en células de glioma U 87MG cultivadas. Por microscopía confocal, se observa FM 4-64 en los endosomas citoplásmicos (arriba a la izquierda) y el fármaco 2 se encuentra en el mismo lugar (arriba a la derecha). Ambas etiquetas colocalizan (abajo a la izquierda, color amarillo);
- 30 La figura 13 es un gráfico que ilustra que la densidad de vasos aumenta en tumores en comparación con el cerebro normal y que el fármaco 2 reduce la densidad de vasos tumorales en un 55%;
- La figura 14 muestra la tinción de inmunofluorescencia de cultivos de glioma U87MG para cadenas de laminina. Los oligos antisentido conjugados con el vehículo PMLA (Fármaco 2) inhiben la expresión de laminina ($\alpha 4$ es roja y $\beta 1$ es verde). Los núcleos se contratiñen con DAPI (azul);
- 35 La figura 15 muestra el análisis de inmunofluorescencia de tumores xenotransplantados usando un anticuerpo monoclonal para la cadena $\beta 1$ de laminina humana; la síntesis de la cadena $\beta 1$ de laminina se inhibió en la GBM después de la administración del fármaco 2; y
- 40 La figura 16 muestra el análisis de transferencia Western de la inhibición de la expresión de la cadena de laminina 8 en dos cultivos de células de glioblastoma multiforme (GBM), U87MG y T98G: -, sin tratamiento, +, tratamiento con el fármaco 2.
- La figura 17 muestra que el fármaco 2 es capaz de cruzar la BBB donde el color rojo representa el fármaco visualizado dentro de los vasos cerebrales y las células tumorales trasplantadas después de la administración intravascular del fármaco.
- 45 Descripción detallada de la invención
- Las propiedades atractivas de PMLA como un vehículo de transporte molecular o de matriz portadora para productos farmacéuticos y productos biofarmacéuticos son las siguientes: no es tóxico ni inmunogénico; su

hidrofobicidad se puede controlar mediante la introducción de cadenas laterales hidrófobas o espaciadores [30]; es biodegradable [31]; y es estable en el torrente sanguíneo. Para dirigir oligos antisentido a un órgano o compartimento específico, las entidades de direccionamiento, tal como los anticuerpos específicos del tumor que favorecen la endocitosis mediada por receptor, se pueden conjugar con el polímero PMLA. Idealmente, el sistema incluye un sistema de liberación para liberar el fármaco del vehículo de transporte molecular; los posibles sistemas de liberación incluyen; a) un enlace disulfuro escindible por el glutatión intracelular, b) un enlace hidrazona sensible al pH, c) un tetrapéptido escindido por la cathepsina B lisosomal, cuya actividad está elevada en diversos tumores (u otras peptidasas); d) una función de liberación intrínseca del endosoma [32, 33]; y e) otros enlaces lábiles o escindibles, tales como enlaces éster. Lo más importante es que los inhibidores de múltiples dianas moleculares se pueden unir fácilmente a una molécula de PMLA.

El material de partida para la síntesis del vehículo de administración de fármacos descrito en la presente solicitud de patente fue PMLA de la fuente natural, los plasmodios de *Physarum polycephalum* [27 y las referencias en la misma]. Los métodos de síntesis química empleados en este documento provienen del fondo general de métodos en química de síntesis, y se han descrito en otros sistemas, no relacionados con el sistema a base de ácido polimálico descrito en este documento. La mayoría de estos métodos debían adaptarse a la situación actual, en particular a las propiedades de los eductos durante el progreso de la construcción química del sistema portador, y con respecto a los métodos de purificación de productos. Para lograr una derivación exitosa con una estequiometría predecible y reproducible de las unidades estructurales funcionales conjugados con el andamio de ácido polimálico, la secuencia de las reacciones con el andamio tuvo que establecerse y organizarse de tal manera que fuera imposible una reacción incontrolada. La validez de los productos se logró y la pureza se controló mediante análisis in situ durante la síntesis gradual, incluidos los análisis químicos cualitativos y cuantitativos, la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), la cromatografía de capa fina (TLC) y el análisis espectroscópico luz ultravioleta/visible/IR así como los métodos espectroscópicos de RMN. Las propiedades de rotura de la membrana del vehículo del fármaco totalmente ensamblado y también de los intermedios de su síntesis se evaluaron mediante un ensayo de membrana hemolítico empírico de rutina [véase 51].

Las referencias de los métodos de síntesis estándar que subyacen al desarrollo de los métodos usados en este documento son en particular:

- Activación de grupos PMLAH-carboxílicos como ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) en analogía con el método de [69].
- Acoplamiento del grupo (2-piridilditio)propionilo a los oligonucleótidos antisentido morfolino (PDP)-morfolino en analogía al método descrito en [51 y las referencias en la misma].
- Conjugación de FITC (isotiocianato de fluoresceína) en analogía con el método para la formación de N-(fluorescein-5'-tiocarbamil) diaminohexano de [71].
- Síntesis de N, N"-bis-(3-maleimidopropionil)poli(etilenglicol) en analogía con el método de [70].
- Introducción de grupos tiol en anticuerpos en analogía con las técnicas descritas de [72, 51 y las referencias en la misma].
- La reacción de mAB OX-26-sulfhidrilo con el conjugado N, N"-bis-(3-maleimidopropionil)-PEG diamida se realizó de manera análoga a las reacciones llevadas a cabo en [52, y 69].
- La síntesis del conjugado PMLA/L-valina/2-mercaptoetilamina/mPEG-NH2 mediante la formación de amida a partir del carboxilato activado con NHS se realizó principalmente como se describe en este documento.
- Síntesis del conjugado PMLA/mAB OX-26/oligonucleótido antisentido morfolino/L-valina/2-mercaptoetilamina/mPEGNH2 por reacción del grupo sulfhidrilo con maleimida;
- Conjugación del FITC-espaciador con el conjugado PMLA/mAB OX-26/oligonucleótido antisentido morfolino/L-valina/2-mercaptoetilamina/mPEG-NH2, representado principalmente una formación de amida por ataque nucleofílico del carboxilato activado con NHS como se describe en este documento.

Los sistemas de administración de fármacos existentes sufren de uno o varios de los siguientes problemas:

- No son multifuncionales, esto es, están limitados con respecto a la variabilidad en el tipo y la cantidad de grupos que se dirigen al tejido por molécula portadora;
- Están limitados por el tipo y número de fármacos conjugados (profármacos) por molécula portadora;
- Están limitados por la solubilidad en fluidos fisiológicos;
- Están limitados por una estabilidad insuficiente contra la degradación en el sistema de circulación;
- No son biodegradables;

- Implican ácidos nucleicos virales u otros fragmentos virales;
 - No son específicos para el tejido tumoral y dañan el tejido del huésped sano
 - Son tóxicos;
 - La síntesis del sistema de administración de fármacos sufre de reacciones secundarias incontrolables;
- 5
- La síntesis del sistema de administración de fármacos tiene solubilidad u otros problemas que hacen que la purificación de los productos de reacción sea difícil o imposible;
 - La síntesis del sistema de administración de fármacos no produce productos reproducibles;
 - La síntesis de variaciones/extensiones estructurales para contener nuevos componentes, mejorando de este modo la especificidad o agudizando la actividad antitumoral del sistema de administración de fármacos no es posible; y
- 10
- La síntesis del sistema de administración de fármacos no se puede ampliar fácilmente.

15

La conjugación controlada de cada módulo funcional reactivo con los grupos carboxílicos activados con NHS (N-hidroxisuccinimida) del andamio del ácido polimérico permite conjugar una variación de diferentes tipos de módulos funcionales reactivos, introduciendo de este modo una variedad de diferentes moléculas de direccionamiento, moléculas de fármaco (profármaco), etc. Los diversos módulos se pueden conjugar con una y la misma molécula de andamio o con diferentes módulos que permiten una mezcla de fármaco binario o ternario, etc. Múltiples módulos funcionales en una y la misma molécula de andamio pueden mostrar efectos biológicamente sinérgicos cuando se introducen simultáneamente en la célula.

La biodegradabilidad se puede lograr empleando ácido polimérico biodegradable como andamio y otras unidades de construcción biodegradables (aminoácidos, proteínas).

20 Descripción de la invención mediante un ejemplo específico

Síntesis de un sistema portador multifuncional basado en ácido polimérico para la administración dirigida a tumores de oligonucleótidos antisentido morfolino

25

La figura 1a muestra la estructura global de una molécula de fármaco típica de la presente invención. Para la síntesis del bloque (z + w), los grupos carboxilo del ácido polimérico (bloque w) se activan como ésteres de NHS y se conjugan a L-valina a través del enlace amida. El bloque y3 es el profármaco oligos antisentido de morfolino que contiene una unidad de liberación de fármaco disulfuro. El bloque y1 es la molécula de direccionamiento del anticuerpo monoclonal (OX26) conjugada con el bloque z + w mediante el espaciador de polietilenglicol (PEG). El bloque x es el protector de PEG contra la degradación, unido por un enlace amida y formado a partir de la PEG-amina disponible comercialmente. El bloque y2 representa los grupos de anclaje sulfhidrilo restantes, que no han sido consumidos por la síntesis en este punto, y que se pueden usar para la conjugación de módulos funcionales adicionales a través de la reacción con el doble enlace de las N-etilmaleimidias sustituidas o simplemente se bloquean por reacción con los N-etilmaleimidias no sustituidas. El bloque n, el grupo indicador fluorescente, se prepara a partir de isotiocianato de fluoresceína (FITC) y N1-Boc-1,6-diaminohexano. La estructura del fármaco se construye mediante un acoplamiento gradual de los bloques (esto es, los módulos) en el conjugado en crecimiento,

30

como se muestra en la figura 1b, bajo un cuidadoso control estequiométrico. El orden de las etapas se puede ajustar fácilmente para adaptarse a diferentes escenarios. Las conjugaciones se llevan a cabo con reactivos de carbodiimida en un solvente orgánico, preferiblemente dimetilformamida. Las reacciones secundarias se evitan mediante la protección adecuada de las cadenas laterales siguiendo los métodos estándar.

35

40

Para el Bloque w se obtiene ácido polimérico altamente purificado a partir de cultivos de *Physarum polycephalum* [24, 25]. El biopolímero se degrada espontánea y enzimáticamente al ácido L-málico [31, 26], que se metaboliza a dióxido de carbono y agua. La sal de sodio no es tóxica ni inmunógena en ratones y conejos respectivamente [27 y las referencias en la misma]. Después de la inyección intravenosa en ratones, el polimalato se eliminó rápidamente por excreción a través de los riñones [73]. Ciertos derivados de polimalato y polímeros de bloque en realidad mostraron efectos positivos en la reparación ósea y la regeneración muscular en ratas [30] o se encontraron biocompatibles en otras investigaciones [32]. El ácido polimérico es un excelente candidato para el diseño de un dispositivo portador de fármacos, debido a su gran abundancia de grupos carboxilo modificables. Estos se pueden conjugar fácilmente con una variedad de diferentes moléculas biológicamente activas de una manera perfectamente controlable con respecto a su estequiometría e integridad. El bloque z se basa en polímeros que contienen grupos L-valina o L-leucina lipófilos y se vuelven cada vez más lipófilos cuando se protonan cuando el pH ambiental cae por

45

debajo del pH 6 durante la maduración de los endosomas a los lisosomas. Este aumento de la lipofiliidad produce una fuga de las membranas endosómicas y provoca la liberación del contenido macromolecular en el citoplasma [33, 74, 75]. El bloque y3 contiene un enlace disulfuro, que es estable en la circulación sanguínea, incluidos los microvasos cerebrales, pero se escinde en el entorno reductor de las células [38]. El bloque y1 contiene un espaciador de polietilenglicol que permite que la unidad estructural dirigida al tejido se una al receptor en la

50

superficie de la célula diana. También protege contra la degradación del polipéptido de direccionamiento. (y3) Se

55

usan los oligonucleótidos de morfolino, que bloquean específicamente la expresión de genes esenciales del tumor, tal como la cadena $\alpha 1$ de laminina. En principio, cualquier otro fármaco oligonucleótido antisentido o profármaco se puede conjugar en este documento, así como una matriz de diferentes fármacos en una única molécula portadora. Estos conjugados se escinden del portador en la unidad de liberación de fármaco dentro del citoplasma, y el (los) fármaco (s) se vuelve eficaz. El bloque y1 ayuda a romper el BBB, que está dirigido por un anticuerpo monoclonal contra el receptor de la transferrina en las células endoteliales del BBB [55]. Además, la bradiquinina sola o conjugada con otras moléculas, también podría ser una molécula de direccionamiento para ser usada para los tumores cerebrales en virtud de receptores específicos [77, 18 y 78]. Una posibilidad adicional para el direccionamiento específico del tumor cerebral es usar un anticuerpo monoclonal contra el receptor de EGF humano [37, 79]. Los receptores de bradiquinina B₂ y el EGFR se expresan en exceso en las células tumorales y también se pueden usar como sitios de direccionamiento de tumores cerebrales en combinación con el receptor de la transferrina. El bloque n añade una etiqueta fluorescente arbitraria, en este documento la fluoresceína, que se conjuga con la estructura del fármaco para facilitar los estudios de orientación del portador en los endosomas de las células tumorales receptoras.

15 Materiales y métodos

Se purificó poli (ácido β -L-málico) (PMLA) a partir del caldo de *Physarum polycephalum* plasmodia cultivado usando métodos desarrollados a partir de [25]. El polímero en forma de sal se fraccionó por tamaños en columnas Sephadex G25. La fracción con una masa molecular promediada en número de 50 kDa (polidispersidad 1.2) se convirtió en el ácido polimérico libre (PMLAH) mediante el paso sobre Amberlite IR-120 (forma H⁺) y se almacenó liofilizada antes de usarla en la síntesis del portador. La ¹H-RMN en D₂O dio los siguientes valores de δ : 3.3 ppm (doblete, los protones de metileno de la cadena principal de poliéster), 5.3 ppm (tripleto, los protones de metina de la cadena principal de poliéster). La ¹³C-RMN desacoplada de banda ancha de protones dio los siguientes valores de δ : 178.4 ppm (-COOH), 74.5 ppm (-CHOH-), 38.9 ppm (-CH₂-) y 174.5 ppm (-CO-). El PMLA-H purificado muestra una absorbancia de la luz UV solo por debajo de la longitud de onda de 220 nm, y carece de absorbancia en 260 y 280 típicos de ácidos nucleicos y proteínas, respectivamente (más detalles se revisan en [27]). Oligonucleótidos antisentido de morfolino™-3'-NH₂ [6] a la cadena α -4 de laminina-8 (AGC-TCA-AAG-CCA-TTT-CTC-CGC-TGA-C) y a la cadena β -1 de laminina-8 (CTA-GCA-ACT-GGA- GAA-GCC-CCA-TGC-C) [50, 34] se adquirieron de Gene Tools (EE. UU.). El anticuerpo monoclonal de ratón contra el receptor de la transferrina de rata CD71 (clon OX-26, isotipo IgG_{2a}) a una concentración de 1 mg/ml de PBS que contenía azida de sodio 10 mM se obtuvo de Chemicon Europe (Reino Unido). Se adquirió IgG_{2a,k} de ratón (UPC 10) de Sigma (Alemania). Se obtuvieron mPEG-amina cromatográficamente pura (PM 5000) y amina-PEG-amina (PM 3400) de Nektar Therapeutics (EE. UU.). Los reactivos y solventes obtenidos de Merck (Alemania), Sigma (Alemania), Pierce (EE. UU.) fueron de la pureza más alta disponible. El diclorometano (DCM) y la N, N-dimetilformamida (DMF) se secaron sobre tamices moleculares (0.4 nm).

Los espectros de ¹H-RMN se registraron en un espectrómetro de transformada de Fourier Bruker Modelo DMX-500 y los cambios químicos se dan en ppm (δ) con respecto a TMS como patrón interno. Los espectros de ¹³C RMN se registraron en el mismo espectrómetro operado a 125.8 MHz. Las separaciones cromatográficas se realizaron con un sistema de HPLC LaChrom D-7000 analítico Merck-Hitachi equipado con detectores de UV y fluorescencia. Cualquiera de las columnas Macherey & Nagel C₁₈-Nucleosil de fase reversa (RP) (250 X 4 mm) con un gradiente binario de 0.1% de TFA (ácido trifluoroacético) en agua - 0.07% de TFA en acetonitrilo a una velocidad de flujo de 1.5 ml/min o se usaron columnas de exclusión de tamaño Bio-Sil SEC 250-5 (5 μ m, 300 X 7.8 mm) con solución reguladora de fosfato de sodio 50 mM pH 7.4 a una velocidad de flujo de 0.75 ml/min. La masa molecular del polímero sal de Na o K se determinó por SEC-HPLC con estándares de poliestileno sulfonato de peso molecular definido (Machery-Nagel). La cromatografía de capa fina (TLC) se realizó sobre las láminas de aluminio F254 de gel de sílice 60 precubiertas de Merck. El eluyente contenía una mezcla de n-butanol, agua y ácido acético (4:2:1 en una base de proporción de volumen).

Síntesis

Síntesis del éster de PMLA-NHS

Se disolvieron 1.16 g de PMLA-H (10 mmol con respecto al monómero de ácido málico) en 30 ml de dimetilformamida anhidra (DMF). Se añadió N-hidroxisuccinimida (NHS) (15 mmol), disuelto en 10 ml de dimetilformamida anhidra (DMF) a la solución de PMLA-H. La temperatura se redujo a 0 °C en un baño de hielo, luego se añadió dicitclohexilcarbodiimida (DCC) (15 mmol) disuelta en 10 ml de DMF. La mezcla de reacción se mantuvo bajo presión reducida a temperatura ambiente hasta que no se desarrollaron burbujas de gas. Después de 30 min a 0 °C, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 h. La mezcla de reacción se mantuvo como se describe anteriormente a presión reducida, seguido de incubación cada 2 h durante el primer día de reacción, y luego cada 6 h durante el segundo día de reacción. Después de dos días de reacción, la dicitclohexilurea se eliminó por filtración y el volumen de reacción se redujo por evaporación a presión reducida. Se añadió DMF anhidra fresca (10 ml) y la dicitclohexilurea residual se eliminó de nuevo por filtración. La mezcla de reacción transparente se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente y las últimas cantidades de dicitclohexilurea (si las hubiera) se eliminaron por filtración. El volumen se redujo a 1-3 ml por evaporación a presión reducida, y el

producto se precipitó mediante la adición de acetato de etilo. El producto amarillo pálido (P1) se recogió por filtración. Se añadió éter dietílico al filtrado para coincidir con la proporción final de 1:1 (acetato de etilo: éter dietílico), y se recogió más de un producto marrón claro por filtración (P2). Luego se añadió n-hexano al filtrado para coincidir con la proporción final de 1:1:1 (acetato de etilo:éter dietílico:n-hexano) y se recogió producto marrón adicional mediante filtración (P3). Los precipitados se dispersaron en los mismos solventes usados para su precipitación y se dejaron toda la noche en frío (-20 °C). Los productos se filtraron y lavaron repetidamente con los mismos solventes fríos. Los productos se purificaron adicionalmente por paso a través de Sephadex LH 20 usando DMF como eluyente permitiendo el flujo por gravedad. El producto que contenía las fracciones se recogió y los solventes se evaporaron a presión reducida. Finalmente, los productos se dispersaron en dietiléter, se recogieron por filtración, se secaron al vacío y se almacenaron a -20 °C.

La pureza/composición de estas preparaciones de éster de PMLA-NHS se analizó mediante espectroscopía de ¹H RMN y UV-VIS. El contenido de grupos NHS se determinó después de la aminólisis de grupos éster NHS con n-butilamina. Se disolvieron 10 mg de éster de PMLA-NHS en 0.5 ml de DMF. Se añadió una porción de 0.5 ml de n-butilamina al 10% a esta solución y la mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la centrifugación, se mezclaron muestras de 20 µL con 80 µL de agua y se analizaron por RP-HPLC empleando agua/0.1% (v/v) de TFA como eluyente. Los grupos NHS fueron controlados por su absorbancia a 260 nm. Su contenido se calculó comparando la absorbancia con la de los estándares de cantidades conocidas de N-hidroxisuccinimida. La relación molar de residuos de ácido málico y grupos NHS en la muestra de éster de PMLA-NHS se calculó combinando estos resultados con las cantidades de residuos de malilo medidas por ¹H-RMN. Por lo general, las proporciones fueron 35, 59 y 85% para P1, P2 y P3, respectivamente. La ¹H RMN en (CD₃)₂SO dio los siguientes valores de δ: 2.8 ppm (singlete, 4H, N-CO-CH₂-), 3.35 ppm (doblete, los protones de metileno de la estructura del poliéster), 5.85 ppm (triplete, los protones metino del esqueleto de poliéster). La reacción se muestra en la figura 2.

Síntesis de los oligonucleótidos antisentido (2-piridilditio)propionil-morfolino (morfolino- PDP)

Se disolvió morfolino-3 (oligómero antisentido -NH₂ (1 µmol) en una mezcla de 900 µL de DMF y 100 µL de agua desionizada. A esta mezcla, se le añadió 20 µL de una solución 100 mM de N-succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) en DMF y se dejó durante 2 horas a temperatura ambiente. El solvente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida a temperatura ambiente. El residuo se disolvió en 1 ml de solución reguladora A (fosfato de sodio 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.2) que contenía EDTA 10 mM y se purificó sobre una columna microspin Sephadex G-25 previamente equilibrada con solución reguladora A. La concentración de oligonucleótido antisentido morfolino-PDP se ajustó a 1 mM y se almacenó a -20 °C.

La pureza del producto se confirmó por TLC y espectroscopia UV mostrando la ausencia de NHS y SPDP. El contenido de los grupos de PDP se determinó midiendo la concentración de 2-tiopiridona después de la reducción con disulfuro de la siguiente manera: el oligonucleótido antisentido morfolino-PDP se incubó con ditiotretitol 0.2 M (DTT) en solución reguladora Tris 0.1 M, pH 9.0 durante 30 min, a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se sometió a RP-HPLC lavando primero durante 10 min con agua destilada y luego eluyendo en 30 minutos con un gradiente de 0 - 60% de acetonitrilo. El producto de reacción 2-tiopiridona se detectó usando absorción UV a 341 nm. La concentración de 2-tiopiridona se midió usando la absorbancia de cantidades conocidas de 2-aldritol (DPDS) reducido como estándares. El rendimiento del nucleótido antisentido de morfolino-PDP fue rutinariamente superior al 80% de la cantidad inicial de oligonucleótido de morfolino-3'-NH₂. Esta reacción se muestra en la figura 3.

Síntesis de N-(fluorescein-5'-tiocarbamoil) diaminohexano

Se disolvió el isómero I del isotiocianato de fluoresceína (90 mg) (FITC, mínimo 98%, 0.23 mmol) en 3 ml de DMF, y se añadieron 76 mg de clorhidrato de N₁-Boc-1,6-diaminohexano (0.3 mmol). La reacción de acoplamiento se inició mediante la adición gota a gota de 0.6 mmol de trietilamina. La mezcla de reacción se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y el volumen se redujo por evaporación a presión reducida (volumen final de aproximadamente 0.5 ml). Se añadió agua fría (5 ml) a la mezcla restante y se acidificó con HCl 1N. El precipitado se recogió por centrifugación, se lavó tres veces con agua fría seguido por centrifugación, hasta que no se podría detectar rastro de N₁-Boc-1,6-diaminohexano en el sobrenadante según lo determinado por TLC y prueba de ninhidrina. El producto final se secó sobre P₂O₅. Esta síntesis se ilustra en la figura 4.

Para eliminar el grupo protector Boc, el producto seco se disolvió en 3 ml de diclorometano (DCM) y la temperatura se redujo con un baño de hielo. Se añadieron dos ml de TFA a la solución que luego se agitó durante 30 minutos en hielo. La reacción fue seguida por TLC. Las manchas fluorescentes fueron visibles bajo luz UV. El solvente se evaporó a presión reducida y el producto ceroso se disolvió en acetona y se precipitó mediante la adición de dietiléter. Para la purificación, el producto se disolvió en 3 ml de DCM/etanol (3: 2, v/v) que contenía 4 ml de ácido acético en 100 ml de mezcla y se pasó a través de una columna de SiO₂ de 2 cm x 12 cm equilibrada con el mismo solvente. El producto fue puro por TLC. Los valores de R_f fueron 0.95 para FITC, 0.98 para N₁-(fluorescein-5'-tiocarbamoil)-N₆-BOC-1,6-diaminohexano, y 0.64 para N-(fluorescein-5'-tiocarbamoil)diaminohexano.

Síntesis de N, N'-bis-(3-maleimidopropionil)poli(etilenglicol)

Se añadieron gota a gota 0.5 g de NH₂-PEG3400-NH₂ (0.147 mmol) disuelto en 3 mL de DMF anhidro a (3-éster de NHS del ácido maleimidopropiónico) (106 mg, 0.4 mmol) disuelto en 5 ml de DMF anhidro con vigorosa agitación a temperatura ambiente. La finalización de la reacción se confirmó mediante TLC y una prueba de ninhidrina negativa. Después de la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, el solvente se eliminó mediante evaporación rotatoria a temperatura ambiente a presión reducida. El producto se disolvió en 2 ml de solución reguladora A (fosfato de sodio 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.2) que contenía EDTA 10 mM. Las impurezas insolubles se eliminaron por centrifugación. El sobrenadante transparente se pasó sobre una columna Sephadex G-25 previamente equilibrada con solución reguladora A. El producto se purificó mediante TLC y prueba de ninhidrina. La solución acuosa del producto se almacenó a -20 °C.

Los espectros de ¹H-RMN del producto disuelto en (CD₃)₂SO indicaron los siguientes valores de δ: 7.05 singlete 4H -HC=CH-, 3.74 triplete 2H N-CH₂, 3.5 hidrógenos singletes de PEG, 3.03 triplete 2H CH₂-CONH. Los valores fueron consistentes con el producto siendo la N,N'-bis-(3-maleimidopropionil)poli(etilenglicol) diamida esperada. El contenido de grupos maleimida se midió indirectamente mediante un método que se basa en la reacción de -HC = CH- con el sulfhidrilo en cantidades dadas de 2-mercaptoetilamina (2-MEA) y la titulación de sulfhidrilo sin reaccionar con 5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzoato (DTNB, reactivo de Ellman) de la siguiente manera. Se añadió una cantidad apropiada de 2-MEA en agua a la solución acuosa de N,N'-bis-(3- maleimidopropionil)poli(etilenglicol) diamida y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió DTNB (25 µL de solución 10 mg/mL en etanol) y se leyó la absorbancia a 412 nm después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente. La absorbancia se estandarizó con cantidades conocidas de 2-MEA, y se calculó la cantidad de grupos sulfhidrilo sin reaccionar. El contenido de grupos maleimida en la muestra de N, N'-bis-(3-maleimidopropionil)poli(etilenglicol) diamida se calculó restando la cantidad de 2-MEA sin reaccionar de la cantidad inicial de 2-MEA. A partir de este valor, se calculó que el rendimiento de la síntesis de N,N'-bis-(3-maleimidopropionil)-poli(etilenglicol) diamida era del 65%. Esta síntesis se muestra en la figura 5.

Introducción de grupos tiol en anticuerpos: reducción de los enlaces disulfuro intrínsecos con 2-mercaptoetilamina (2-MEA)

El anticuerpo monoclonal de ratón (mAB) contra el receptor de la transferrina de rata CD71 (clon OX-26, isotipo IgG_{2a}) se obtuvo comercialmente a una concentración de 1 mg/ml de PBS que contiene azida sódica 10 mM. Se usó el anticuerpo monoclonal de ratón IgG_{2a,κ} (UPC 10, Sigma) en lugar de mAB OX-26 para generar un conjugado de control y también una curva estándar para las mediciones de proteínas. La solución de mAB OX26 se concentró usando un filtro de membrana de microcentrifuga (filtros de microcentrifuga Sigma Ultrafree-CL, celulosa regenerada, corte de 30 kDa) a 4 °C y 5000 x g. La solución reguladora de almacenamiento de mAB se cambió a solución reguladora A (fosfato de sodio 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.2) que contenía EDTA 10 mM. La concentración de mAB se ajustó a 3-5 mg/ml. Se disolvió mAB UPC 10 de ratón en solución reguladora A para dar la misma concentración que mAB OX 26. Se agitó clorhidrato de 2-mercaptoetilamina sólida (2-MEA) (6 mg/ml) en las soluciones de anticuerpo y la mezcla se incubó durante 90 min a 37 °C. Los anticuerpos reducidos en disulfuro se purificaron por diafiltración con solución reguladora A (se desgasifican bajo N₂) usando filtros de membrana de microcentrifuga (celulosa regenerada, cortes: 30 kDa) a 4 °C y 5000 x g. La etapa se realizó hasta que el diafiltrado estuvo completamente libre de 2-MEA medido espectrofotométricamente a 412 nm después de la incubación con 5, 5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB, reactivo de Ellman). El número de grupos tiol en las soluciones de anticuerpos reducidos en disulfuro se calculó leyendo la absorbancia a 412 nm ($\epsilon = 14.15 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 25 °C) después de 10 minutos de incubación de 0.5 ml de solución de anticuerpos con 25 µl de solución de DTNB (10 mg/ml en etanol) a pH 8.0. La concentración de proteína de anticuerpo se midió según el método de [65]. Los resultados indicaron que los anticuerpos reducidos no regulados contenían 3.1-3.5 grupos tiol por molécula de molécula de IgG. El análisis SEC-HPLC mostró solo un pico de PM 150 kDa, lo que indica que el anticuerpo reducido había mantenido su integridad molecular. Las preparaciones fueron bastante estables en presencia de EDTA incluso en ausencia de agente reductor, y no se observaron pérdidas significativas en los grupos tiol libres durante la noche a 4 °C.

Síntesis del conjugado de mAB OX-26/N,N'-bis-(3-maleimidopropionil)-PEG diamida

Inmediatamente después de la preparación, la solución de anticuerpo reducido se añadió gota a gota a la solución acuosa agitada de N,N'-bis-(3-maleimidopropionil)-PEG diamida (en un exceso molar de 50 veces de grupos de maleimida sobre los grupos tiol del anticuerpo) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y la N,N'-bis-(3-maleimidopropionil)-PEG diamida sin reaccionar se eliminó mediante diálisis en solución reguladora A (membrana de 50 kD, durante la noche con tres veces el cambio de solución reguladora). La preparación del conjugado de anticuerpo-N,N'-bis-(3-maleimidopropionil)-PEG diamida se usó inmediatamente para reacciones sintéticas adicionales.

La finalización de la reacción de conjugación se indicó mediante los resultados de SEC-HPLC. Cuando se midió la absorbancia a una longitud de onda de 220 nm, el único material eluido estaba en la posición de 7.20-7.26 min que representaba el conjugado, mientras que ninguno se eluyó en la posición de 13.4-13.7 min para el N,N'-bis-(3-maleimidopropionil)-PEG diamida sin reaccionar. El contenido de grupos maleimida en el conjugado de anticuerpos se determinó indirectamente usando 2-MEA y el reactivo de Ellman como se describió anteriormente para la síntesis

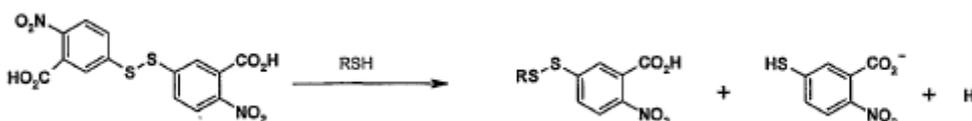
de la *N,N'*-bis-(3-maleimidopropionil)-PEG diamida. La concentración de proteína de anticuerpo se determinó según el método de [65]. Los resultados indicaron 3.0 grupos maleimido por molécula de anticuerpo y estuvieron según la suposición de que los grupos tiol libres de las preparaciones de anticuerpos reducidos por disulfuro habían reaccionado completamente con la *N,N'*-bis-(3-maleimidopropionil)-PEG diamida. Además, como el análisis SEC-HPLC mostró solo un pico de PM 150 kDa, los productos de reticulación se podrían excluir.

Síntesis del conjugado PMLA / L-valina / 2-mercaptoetilamina / mPEG₅₀₀₀-NH₂

Para la síntesis de PMLA/L-valina/2-mercaptoetilamina/mPEG-NH₂ conjugado, se disolvió 1 mmol (con respecto a unidades de malilo) de éster de PMLA-NHS (preparación P3: 85% de éster de NHS) en 10 ml de la DMF anhidra. Primero, se añadieron mPEG5000-NH₂ (50 μmol en 2 ml de DMF, correspondiente al 5% en moles de las unidades de malilo activadas con NHS) y 200 μmol de N-etilmorfolina en esta secuencia y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos hasta que la reacción se completó según la TLC con la prueba de ninhidrina (reacción de ninhidrina negativa versus positiva en el origen). A continuación, se añadieron 200 μmol de una solución 50 mM de 2-MEA en DMF (correspondiente al 20% en moles de grupos malilo activados con NHS) y 200 μmol de N-etilmorfolina a la mezcla de reacción con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. De nuevo, la reacción se completó según TLC (Rf = 0.27 para 2-MEA y Rf = 0 para el conjugado de polímero) con la reacción de ninhidrina. La síntesis se muestra en la figura 6.

De acuerdo con la estequiometría de los reactivos añadidos, el 4.5% y el 19.3% de los equivalentes de éster de PMLA-NHS se habían reemplazado por PEG y 2-MEA, respectivamente. Los restantes equivalentes de ésteres de NHS sin reaccionar se dejaron conjugar con L-valina (1 mmol en 5 ml de agua), y se añadieron gota a gota en presencia de 0.1 g de NaHCO₃ (1.2 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y se neutralizó enfriando con HCl 0.1 M. El solvente se evaporó a 30 °C a presión reducida. El producto seco se disolvió en 10 ml de solución reguladora A (fosfato de sodio 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.2) que contenía EDTA 10 mM y 1 ml de DTT 0.5 M. Después de 10 minutos a temperatura ambiente, la mezcla se centrifugó a 20 000 x g durante 5 minutos y el sobrenadante transparente se pasó sobre una columna Sephadex G25 (2.5 cm x 60 cm) previamente equilibrada con solución reguladora A, y el producto que contenía las fracciones se liofilizó.

La composición del conjugado PMLA / L-valina / 2-mercaptoetilamina / mPEG-NH₂ se analizó mediante espectroscopía ¹H RMN y UV-VIS. El contenido de los grupos tiol se midió mediante la adición de 25 μl de solución de DTNB (10 mg/ml en etanol) a 1 mg del conjugado liofilizado disuelto en 1 ml de solución reguladora fosfato de sodio (pH 8.0, 100 mM) y leyendo la absorbancia a la longitud de onda de 412 nm después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente. En el caso de la preparación del conjugado PMLA / L-valina / 2-mercaptoetilamina / mPEG-NH₂ / FITC (véase más abajo), la mezcla de reacción también se diafiltró con un filtro de membrana de microcentrifuga (celulosa regenerada, corte de 5 kDa) a 5000 x g antes de leer la absorbancia de 412 nm. El método de Ellman para analizar los tioles se basa en la reacción de los tioles con el DTNB cromogénico (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato, FW 396.4) mediante el cual se mide la formación del ácido amarillo 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB).



La razón de la filtración en el caso del conjugado FITC es separar TNB del conjugado FITC porque la presencia de fluorescencia hace imposible la detección de TNB. Durante la filtración, TNB pasa la membrana, se retienen los conjugados FITC y se mide la absorbancia del filtrado (la filtración no es para la eliminación del colorante libre. El colorante libre ya se eliminó antes de esta reacción).

El contenido de sulfhidrilo se calculó con respecto a los estándares de 2-MEA. El contenido de las unidades estructurales de L-valilo se determinó cuantificando los grupos amino libres después de la hidrólisis total usando el ensayo de ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) y RP-HPLC de la siguiente manera: se colocaron 1 mg del conjugado y 30-50 μl de HCl 6 N en un tubo capilar de 100 μl. El capilar sellado se incubó en un horno a 100 °C, durante 12 a 16 h. Después de la hidrólisis, los contenidos se transfirieron a un tubo Eppendorf (enjuagando el tubo capilar con agua para que fuera cuantitativo) y se evaporaron hasta completar la sequedad mediante calentamiento suave. Este material se volvió a disolver en agua y se centrifugó. Se añadió una parte alícuota de 10-30 μl del sobrenadante a 300 μl de solución reguladora de bicarbonato de sodio (0.4 g de NaHCO₃ en 10 ml de agua, pH 8.5). Después de la adición de 150 μL de solución acuosa de TNBS al 0.1% (p/v), la mezcla se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Después de la centrifugación, se separaron 20 μL de la mezcla de reacción mediante RP-HPLC usando un gradiente lineal de 30 minutos (0-10 minutos, 100% de agua, 10-40 minutos de 0-60% de acetonitrilo). El contenido de unidades estructurales de valilo se calculó sobre la base de la absorbancia de 340 nm en el eluyente con respecto a las cantidades conocidas de L-valina como estándares. La relación molar de mPEG: valina: 2-MEA del conjugado se determinó por ¹H RMN.

Síntesis de conjugado PMLA / mABOX-26 / oligonucleótido antisentido morfolino / L-valina / 2-mercaptoetilamina / mPEG-NH₂

Se añadió gota a gota mAB OX-26-PEG-maleimida recién preparada al conjugado PMLA / L-valina / 2-mercaptoetilamina / mPEG-NH₂ a 4 °C con agitación. Se aplicó un exceso de 100 molar de grupos tiol libres (conjugado) sobre grupos maleimido, permitiendo que todos los anticuerpos se conjugaran con el polímero. Después de 30 minutos de incubación, la reacción se completó. La integridad de la reacción se confirmó por SEC-HPLC. El conjugado PMLA / mAB OX-26 / L-valina / 2-mercaptoetilamina / mPEG-NH₂ se purificó mediante diafiltración en solución reguladora A usando filtros de membrana de microcentrifuga (celulosa regenerada, corte de PM de 100 kDa) a 4 °C y 5000 x g. El conjugado de PMLA que contiene mAb fue retenido por el filtro y solo el conjugado de PMLA / L-valina / 2-mercaptoetilamina / mPEG-NH₂ libre de proteínas pasó a través del filtro. La diafiltración se repitió hasta que no se detectó rastro del conjugado de polímero libre de proteínas en el diafiltrado como se confirmó con SEC-HPLC.

El contenido de proteína del conjugado PMLA / mAB OX-26 / L-valina / 2-mercaptoetilamina / mPEG-NH₂ se midió mediante el método de [66]. La misma cantidad de mAb no conjugado mostró una absorbancia aproximadamente un 10% mayor y, de este modo, el contenido de proteína medido se corrigió por un factor de 0.9. (Este factor se derivó empíricamente del hecho de que, aunque no se encontró que ningún anticuerpo se filtre a través de la diafiltración, el anticuerpo retenido (conjugado) representó solo el 90% del anticuerpo educto). No se conoce la razón de esta discrepancia. La concentración de los grupos tiol libres restantes del conjugado que contiene proteína se determinó como se describe anteriormente. Se encontró que aproximadamente el 70% de los grupos tiol iniciales todavía estaban presentes. La concentración del conjugado que contiene proteína se ajustó a 3 mM con respecto a los grupos tiol.

En la siguiente etapa, se añadieron gota a gota 5 μmol de oligonucleótidos antisentido morfolino-PDP para las cadenas α4 y β1 de laminina 8 (5 ml de la solución 1 mM de oligonucleótidos antisentido morfolino-PDP) con agitación a la solución purificada del conjugado PMLA / mAB OX-26 / L-valina / 2-mercaptoetilamina / mPEG-NH₂ que equivale a una concentración de 15 μmol de grupos tiol libres (5 ml de solución 3 mM del conjugado que contiene proteína). La relación molar de la cadena α4 antisentido a la cadena β1 antisentido fue de 1:1. La mezcla de reacción se incubó durante la noche a 4 °C. La finalización de la reacción se confirmó por SEC-HPLC, lo que indica un pico único en el eluyente con una absorbancia de 260 nm y la ausencia de absorbancia en las posiciones de los oligonucleótidos antisentido morfolino-PDP libres. El conjugado PMLA / mAB OX-26 / oligonucleótido antisentido morfolino / L-valina / 2-mercaptoetilamina / mPEG-NH₂ obtenido se purificó mediante diafiltración usando un filtro de membrana de microcentrifuga (celulosa regenerada, corte:100 kDa) a 4 °C y centrifugación a 5000 x g. El contenido de los grupos sulfhidrilo libres en esta etapa se determinó con el reactivo de Ellman a 412 nm. El contenido de oligonucleótidos antisentido morfolino se midió por absorbancia a 260 nm después de la reducción de los grupos disulfuro con DTT 50 mM durante 2 horas a 37 °C y la separación por SEC-HPLC. Específicamente, los picos de absorción de luz de 260 nm se compararon con los obtenidos para los oligonucleótidos antisentido morfolino PDP-reducidos como estándares.

El contenido proteico del conjugado PMLA / mAB OX-26 / oligonucleótido antisentido morfolino / L-valina / 2-mercaptoetilamina / mPEG-NH₂ se midió mediante el método de [65]. La relación molar de anticuerpo: oligonucleótido antisentido morfolino varió de 1:20 a 1:26, resultando un valor y1 de 0.19%-0.25% (véase la figura 7 para la síntesis general). Los grupos sulfhidrilo libres se bloquearon con N-etilmaleimida, y el reactivo sin reaccionar se eliminó mediante diafiltración como anteriormente.

Conjugación de FITC con el conjugado PMLA / mAB OX-26 / oligonucleótido antisentido morfolino / L-valina / 2-mercaptoetilamina / mPEG-NH₂

Para la detección en condiciones biológicas, el conjugado PMLA / mAB OX-26 / oligonucleótido antisentido morfolino / L-valina / 2-mercaptoetilamina / mPEG-NH₂ se marcó covalentemente con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Sin embargo, esta etiqueta se introdujo después de la conjugación de mPEG-NH₂ a los ésteres de PMLA-NHS indicados anteriormente. La solución de N-(fluorescein-5'-tiocarbamoil) diamino-hexano se preparó en una mezcla de DMF y PBS (1:1) hasta una concentración final de 25 mM. A la solución del conjugado mPEG-NH₂/PMLA (1 mmol con respecto a las unidades de malilo del éster de PMLA-NHS, preparación P3: 85% de éster de NHS) 25 μmol de N-(fluorescein-5'-tiocarbamoil) diamino-hexano (n = 2.5% en la figura 7) y se añadieron 100 μmol de N-etilmorfolina, y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. La reacción fue seguida por TLC. Una vez completada la reacción, la fluorescencia se detectó solo en el origen. La construcción de FITC con el conjugado PMLA / mAB OX-26 / oligonucleótido antisentido morfolino / L-valina / 2-mercaptoetilamina / mPEG-NH₂ luego siguió la misma ruta que la descrita anteriormente en ausencia del colorante. El contenido de FITC en los conjugados se midió por absorción de la unidad estructural FITC a 490 nm. Los conjugados que portan FITC también fueron detectados por un detector de fluorescencia Merck-Hitach con la longitud de onda de excitación establecida a 447 nm y la longitud de onda de emisión establecida a 514 nm. El contenido de FITC se calculó comparando la absorbancia o la fluorescencia de las muestras con la de las muestras estándar generadas por conjugación cuantitativa de una cantidad variable de FITC con el polímero portador como se describe anteriormente. El conjugado se usó directamente para experimentos de cultivo celular. Esta síntesis se muestra en la figura 8.

Ensayo de hemólisis. La figura 9 muestra la actividad disruptiva de la membrana de los polímeros medida con un ensayo de hemólisis de glóbulos rojos (RBC). Los RBC humanos frescos se aislaron por centrifugación de sangre humana completa a 2000 g durante 5 min. Los RBC se lavaron tres veces con solución reguladora de fosfato de sodio 100 mM fría del pH deseado (pH 5.85 o pH 5.5). Las pellas finales se volvieron a suspender en la misma solución reguladora para dar una solución con 10^8 RBC por 1 ml. Los polímeros se disolvieron en solución reguladora de fosfato de sodio dibásico 100 mM al pH deseado a una concentración de 10 mg/ml. La concentración de polímero fue de 2.5 nmol/ 10^8 RBC. Se usó hemólisis en agua destilada para producir un 100% de lisis. Los RBC en solución reguladora sin polímero se usaron como controles de referencia. El ensayo de hemólisis se realizó agregando la solución de polímero a los RBC suspendidos en 1 ml de solución reguladora apropiada. Los RBC se mezclaron invirtiendo el tubo varias veces y se incubaron durante 1 h en un baño de agua a 37 °C. Después de la incubación, los RBC se centrifugaron durante 10 minutos a 13,500 x g para sedimentar las células intactas y la lisis se determinó midiendo la absorbancia de los sobrenadantes a 541 nm, lo que refleja la cantidad de hemoglobina liberada por los RBC. El aumento relativo de $100(A - A_0)/A_{total}$ en la absorbancia a 541 nm de longitud de onda del sobrenadante libre de células se midió como un indicador de rotura de membrana. Los resultados muestran que PMLA-PEG-Valina, PMLA-PEG-Valina-AS y PMLA-PEG-Valina-AS-mAB infieren desestabilización de membrana en contraste con PMLA-PEG que estabiliza las membranas de RBC. La comparación muestra que la desestabilización se debe a la presencia de valina conjugada con PMLA. Al disminuir el pH (simulando la maduración de los endosomas para convertirse en lisosomas), los grupos carboxilo de la valina se protonan, y la desestabilización aumenta debido a la lipofilia aumentada de las unidades estructurales de valina de carga neutralizada.

Liberación de los oligos de morfolino. Las figuras 10a y 10b muestran la liberación de oligonucleótidos antisentido morfolino del portador de fármaco debido a la escisión del enlace disulfuro por el glutatión (glutatión-SH). La escisión del enlace disulfuro es una reacción de dos etapas. En la primera etapa, un equivalente de glutatión-SH reacciona con el disulfuro formando un oligonucleótido antisentido disulfuro mixto -S-S-glutatión (columnas rayadas) (Figura 10a) y un equivalente de oligonucleótido antisentido-SH libre (columnas sólidas). Con el tiempo, el disulfuro mixto disminuye y el antisentido libre aumenta. Esta reacción es rápida como se ve en la figura 10b. En la segunda etapa, el disulfuro mixto reacciona con un segundo equivalente de glutatión para producir el disulfuro glutatión-S-S-glutatión y el oligonucleótido antisentido-SH libre. Esta segunda reacción es lenta. El mecanismo de dos etapas y las velocidades relativas de las reacciones son típicas de esta llamada reacción de intercambio de disulfuro. Los resultados muestran que los oligonucleótidos se escinden muy eficientemente del portador del fármaco en el citoplasma, que contiene glutatión a esta concentración dada.

Para imitar la liberación citoplásmica de oligonucleótidos antisentido morfolino del vehículo del fármaco como se muestra en las figuras, se añadió GSH (γ -L-glutamyl-L-cisteinilglicina, PM 307.33) 5 mM a la mezcla de reacción a temperatura ambiente. La mezcla contenía 0.25 mM del vehículo del fármaco en agua. En diversos momentos, la reacción se detuvo mediante la adición de un exceso de N-etilmaleimida (concentración final 20 mM) sobre las unidades estructurales sulfhidrilo totales. El antisentido reducido se detectó como N-etilmaleimidilo antisentido. Los productos de reacción se separaron por HPLC y los morfolino antisentido liberados se detectaron por su absorbancia UV a 260 nm. Los resultados se muestran en la figura 10b. Una liberación completa (100%) se refiere a la reducción en la presencia de DTT 50 mM a 37 °C, durante 1 h. El análisis de HPLC se realizó con una unidad de HPLC analítica Merck-Hitach usando una columna de filtración en gel. La separación se llevó a cabo en una columna (300 x 7.7 mm) Macherey & Nagel 125-5 GFC-HPLC usando solución reguladora de fosfato de sodio (50 mM, pH 7.4) con una velocidad de flujo de 0.75 ml/min.

Tratamiento del glioblastoma humano cultivado en el cerebro de una rata desnuda con oligonucleótidos antisentido laminina-8 conjugados con ácido poli-L-málico.

La administración específica de fármacos es crucial para tratar tumores y reducir los efectos secundarios de las células normales. La inhibición simultánea de varias dianas moleculares al nivel de la síntesis de proteínas puede ser altamente eficaz para prevenir el crecimiento y la progresión del tumor. La sobreexpresión de las cadenas de laminina-8 está asociada con la progresión del glioma, y el bloqueo de laminina-8 inhibe la invasión del glioma in vitro [34].

Métodos

Ácido polimálico (PMLA). Una construcción de administración de fármacos multifuncional consiste en módulos unidos a los grupos carboxilo colgantes de ácido polimálico (PMLA). El polímero es un producto natural de *Physarum polycephalum* [27]. Los módulos son (1) oligonucleótidos antisentido morfolino conjugados con el andamio por enlaces disulfuro, enlaces que se escinden en el citoplasma para liberar el fármaco libre, (2) anticuerpos contra el receptor de la transferrina para la selección de células cancerosas y endocitosis mediada por receptor, (3) L-leucina conjugada con PEG de cadena corta y L-valina directamente acoplada, ambas unidas a través de enlaces amida, para proporcionar una lipofilia dependiente del pH para romper las membranas endosómicas, (4) PEG de cadena larga para aumentar el tiempo en circulación, y (5) moléculas indicadoras fluorescentes (fluoresceína, Cy5 o fluoróforos similares) para detectar la molécula de construcción dentro del tejido/célula.

Esquema de fármacos usados para el tratamiento de animales.

- Fármaco 1: oligo antisentido para laminina $\alpha 4$ + oligo antisentido para laminina $\beta 1$ ($\alpha 4$: $\beta 1$ = 1:1);
 - Fármaco 2: oligo antisentido para laminina $\alpha 4$ + oligo antisentido para laminina $\beta 1$ ($\alpha 4$: $\beta 1$ = 1:1) + anticuerpo monoclonal receptor anti-transferrina (anticuerpo OX-26 para rata CD71 de Chemicon International) como vehículo para el suministro para las células de división rápida [35,36,37, y 38];
- 5
- Fármaco 3: oligo antisentido para laminina $\alpha 4$ + oligo antisentido para laminina $\beta 1$ + oligo antisentido para EGFR ($\alpha 4$: $\beta 1$: EGFR = 1:1:1);
 - Fármaco 4: oligo antisentido para laminina $\alpha 4$ + oligo antisentido para laminina $\beta 1$ + oligo antisentido para EGFR ($\alpha 4$: $\beta 1$: EGFR = 1:1:1) + anticuerpo del receptor anti-transferrina.
- 10
- Fármacos 1A, 2A, 3A y 4A fueron idénticos a los fármacos del número correspondiente (esto es, el fármaco 1 fue idéntico al fármaco 1A), excepto que se usaron los oligos de sentido correspondiente en lugar de los oligos antisentido.

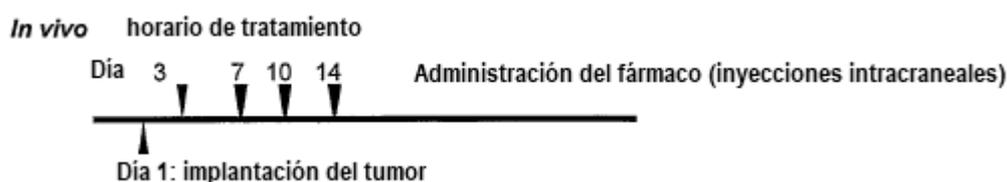
Fármaco 1: oligo nucleótido antisentido para cadena $\alpha 4$ de laminina y oligo nucleótido antisentido para cadena de laminina $\beta 1$ conjugada con PMLA;

Fármaco 2: nucleótido de oligo antisentido para laminina $\alpha 4$, nucleótido de oligo antisentido para laminina $\beta 1$ y anticuerpo monoclonal anti-receptor de la transferrina (anticuerpo OX-26 de Chemicon International) conjugado con PMLA. Los controles (Fármacos 1A y 2A) fueron los mismos conjugados portadores con los oligos antisentido reemplazados por oligos de sentido correspondiente. La línea celular de glioblastoma U-87MG humano se usó para experimentos in vitro y se inyectó intracranalmente en ratas homocigóticas criadas desnudas NIH-RNU-MNIH (Taconic Inc.).

20 Se usaron ratas criadas desnudas NIH (Tac: N: NIH-Wln, Taconic) para estas pruebas. Para el tratamiento antisentido, se usan oligos de morfolino (Gene Tools, LLC) como los más específicos, estables y efectivos tanto in vitro como in vivo. Los morfolininos se han usado con éxito en el pasado para estudios in vitro, pero in vivo, su administración ha sido menos exitosa [6, 7]. El ácido poli-L-málico (PMLA) se usó como un portador de administración para que los morfolininos entraran a las células. El principio del método para la purificación de PMLA ha sido descrito [25]. Se usó un método de producción de PMLA a escala ampliada [27]. La química de los grupos funcionales de PMLA se ha investigado [28, 29], lo que demuestra que la derivación química y la purificación de los productos en solventes tanto orgánicos como acuosos se pueden lograr fácilmente. Para nuestros experimentos, la PMLA se conjugó químicamente con un anticuerpo monoclonal contra el receptor de la transferrina, para que el fármaco sea más específico para las células de división rápida [35, 36, 37 y 38], además de dirigirse a las cadenas de laminina-8 específicas del tumor.

35 Se realizaron estudios preliminares de toxicidad para oligonucleótidos de morfolino, PMLA y su conjugado después de la síntesis completa. 30 días después de la inyección de cada producto químico, se realizaron análisis brutos y micro patológicos, y no se observaron cambios anormales. Los animales no desarrollaron anomalías neurológicas y sus apetitos también eran normales. Los sujetos de prueba en animales se crearon inyectando células de glioblastoma U-87MG humano intracranalmente usando un dispositivo estereotáctico. Los tratamientos farmacológicos comenzaron tres días después de la inyección de células tumorales.

Para el tratamiento intracranial, a las ratas se les inyectaron oligos antisentido en los días 3, 7, 10 y 14 (cuatro tratamientos en total) como se muestra a continuación.



40 Se inyectaron grupos de 12 ratas cada uno con oligos para las cadenas $\alpha 4$ + $\beta 1$ de laminina-8 en dosis de 0.5 mg/kg o 2.5 mg/kg. A los grupos de control de 11 ratas se les inyectaron oligos en sentido a la cadena $\alpha 4$ + cadena $\beta 1$ a dosis de 0.5 mg/kg o a 2.5 mg/kg. Todos los procedimientos quirúrgicos y no quirúrgicos se realizaron según el protocolo 001118 de IACUC, con fecha de agosto de 2003. Para el tratamiento intracarotídico, a un grupo de ratas se les implantó un catéter en la arteria carótida justo después de la implantación del tumor. El catéter se conectó a un puerto de inyección subcutánea implantable. A las ratas se les administró una infusión de 900 μ l de solución de oligos antisentido y sentido (0.06 ml por minuto durante 15 minutos con una bomba peristáltica) en la arteria carótida derecha a través de la cámara del puerto subcutánea seguida de lavado con heparina. Las ratas se sacrificaron 30 minutos después del final de la infusión. El control consistió en: (a) 3 ratas que fueron sacrificadas el día 40 sin ningún tipo de tratamiento para obtener tejido de control normal, y (b) 4 ratas con tumores que se inyectaron de

forma simulada intracranalmente con PBS en los días 1, 3, 7, 10 y 14, y sacrificadas para la recolección de tejido tan pronto como desarrollaron síntomas neurológicos causados por la progresión del tumor.

Resultados

5 Tratamiento de tumores intracraniales. Las dosis del fármaco 2 de 0.5 y 2.5 mg/kg fueron iguales para el tratamiento en el estudio de supervivencia. Después de la administración intracranial de cuatro dosis del fármaco 2, el tiempo de supervivencia del animal se incrementó en un 30%, $p < 0.008$ (Figura 11), en comparación con las ratas tratadas con PBS (simulado) u oligos con sentido (Fármaco 2A). Dos tratamientos, sin embargo, solo produjeron un efecto marginal. El fármaco 1 sin anticuerpo del receptor de la transferrina no afectó la supervivencia. Por lo tanto, el mecanismo de administración celular del fármaco es probablemente la endocitosis mediada por receptor de la transferrina. Curiosamente, la adición de antisentido a EGFR para el fármaco 2 (Fármaco 4) dio como resultado la pérdida de actividad, posiblemente debido al aumento de la supervivencia de las células glioma en condiciones hipóxicas con EGFR inhibido [39].

10 El mecanismo de interiorización del fármaco se investigó en células de glioma cultivadas. Cuando las células se trataron con el fármaco 2 marcado con fluoresceína y el marcador endosomal FM 4-64 marcado con rodamina (Molecular Probes, Eugene, OR), la tinción de ambos compuestos mostró una colocalización. En 10 minutos, las manchas se localizaron cerca de la membrana celular y en 30 minutos se encontraron ambas etiquetas en los endosomas (Figura 12).

15 Si las células se trataron previamente con el anticuerpo del receptor de la transferrina y luego se trataron con el fármaco 2 en diez minutos, el fármaco no se observó en el citoplasma (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que el anticuerpo del receptor de la transferrina se requiere como parte del fármaco activo porque permite la penetración del fármaco en las células mediante endocitosis mediada por receptor, después de lo cual los oligos antisentido pueden liberarse dentro de las células diana. Si las células se tratan previamente con anticuerpo libre contra la transferrina, los receptores se bloquean y el anticuerpo en el fármaco no se puede unir.

20 Se encontró que el fármaco 2 disminuye la densidad de los vasos y la expresión de la cadena de laminina específica en gliomas humanos xenotransplantados a ratas desnudas. Se demuestra que el fármaco 2 diseñado para inhibir la expresión de laminina 8 reduce la densidad de los vasos en los tumores. Estos vasos se visualizaron mediante inmunotinción para el factor de von Willebrand. El número de vasos se contó tanto en animales tratados con fármaco como no tratados, en cinco campos microscópicos en tres secciones en serie (15 campos por tumor) con un aumento de 200 x, usando un microscopio Zeiss Axioscop conectado a un sistema de captura de imágenes (Hamamatsu, Japón). Los datos se ingresaron en el software NIH ImageJ para cuantificar los vasos. La significación estadística fue determinada por ANOVA.

25 Angiogénesis. Como se muestra en la figura 13, la densidad microvascular en los tumores humanos U87MG sin tratamiento fue significativamente mayor que en el cerebro normal. Después de cuatro tratamientos intracraniales con fármaco 2, la densidad de vasos tumorales se redujo en un 55%. Los datos se presentan para los cerebros de control de tres ratas operadas de forma simulada (normales) (45 campos microscópicos), cinco ratas (75 campos microscópicos) con tumores no tratados y cinco ratas con tumores tratados con el fármaco 2 (75 campos microscópicos). Los resultados confirman el mecanismo de acción antiangiogénico del fármaco 2 diseñado para inhibir la expresión de laminina-8.

30 Inmunotinción de la cadena de laminina. Fue importante mostrar que el fármaco 2 inhibió de hecho la expresión de las cadenas de laminina-8 dirigidas. Para este fin, los experimentos se realizaron tanto in vivo como in vitro. Para la inmunotinción tumoral, se usó un anticuerpo contra la cadena $\beta 1$ de laminina-8 humana que no reconoce la laminina de rata pero reacciona con la laminina derivada del tumor. La figura 14 muestra el efecto en el cultivo celular donde el antisentido elimina efectivamente la inmunotinción. Como se muestra en la figura 15, el fármaco 2 también redujo eficazmente la inmunotinción para la cadena $\beta 1$ de laminina en tumores humanos xenotransplantados.

35 La inhibición de la expresión de laminina-8 in vitro se evaluó en medios condicionados de dos gliomas humanos cultivados, U87MG y T98G, tratados durante 3 días con el fármaco 2. El análisis de transferencia Western en la figura 16 muestra una reducción marcada de la cadena $\alpha 4$ de laminina (disminución de tres veces la densidad por densitometría) y desaparición de la cadena $\beta 1$ de laminina. Por lo tanto, el fármaco 2 inhibe eficazmente la expresión de cadenas de laminina diana tanto in vivo como in vitro.

40 Tratamiento intracarotídeo e intravenoso de tumores in vivo.

45 Catorce días después de la inoculación de células de glioma U87-MG humanas en el cerebro de rata para el tratamiento intracarotídeo, al grupo de 3 ratas se le implantó un catéter en la arteria carótida derecha después de la implantación del tumor. El catéter se conectó a un puerto de inyección subcutánea implantable. A las ratas se les administró una infusión de 900 μ l de solución de oligos antisentido y sentido (0.06 ml por minuto durante 15 minutos con una bomba peristáltica) en la arteria carótida derecha a través de la cámara de acceso subcutánea seguida de lavado con heparina. El fármaco 2 se inyectó a una concentración de 2.5 μ g/kg para el tratamiento intracarotídeo o a través de la vena de la cola a una concentración de 5 μ g/kg (3 ratas también). La distribución del fármaco se

examinó a las 1, 3, 12 y 24 horas después de la inyección. Usando la unidad de fluorescencia, se detecta que el fármaco en células tumorales trasplantadas (tinción intensa) y células vasculares (tinción más clara) del cerebro (Figura 17). El fármaco 2 se visualizó por medio de un anticuerpo teñido con rodamina que marca (en rojo) el anticuerpo transferrina portado por el fármaco 2. Los núcleos celulares se contrañen con DAPI (azul). El cerebro de rata (panel derecho) muestra una tinción limitada, principalmente vascular, mientras que las células tumorales U87MG trasplantadas (panel izquierdo) están fuertemente marcadas. La concentración máxima en estas ubicaciones se logró en un punto de tiempo de 3 y 12 horas después de la inyección del fármaco. Estos resultados confirman que el fármaco 2 penetra en la barrera hematoencefálica (BBB), posiblemente por medio de endocitosis mediada por receptor.

Conclusiones. Se ha desarrollado un modelo in vivo que es apropiado para estudiar la expresión de laminina-8 y su inhibición en tumores humanos. La combinación de oligos antisentido con cadenas $\alpha 4$ y $\beta 1$ de laminina-8 (bloqueo de laminina-8) combinadas con un nuevo vehículo de administración de fármacos, PMLA, inhibió eficazmente la expresión de laminina-8 en un glioma humano intracraneal xenoinjertado en ratas. Después de un tratamiento antisentido preliminar cuatro veces; la supervivencia de los animales tratados con glioma aumentó significativamente, con $p < 0,008$. Estos datos indican que los fármacos antisentido basados en PMLA que usan laminina 8 como un objetivo terapéutico son eficaces para inhibir los tumores cerebrales humanos.

Referencias

1. Astriab-Fisher A, Sergueev DS, Fisher M, Shaw BR, Juliano RL. Antisense inhibition of P-glycoprotein expression using peptide-oligonucleotide conjugates. *Biochem Pharmacol*, 60:83-90,2000.
2. Komata T, Kondo Y, Koga S, Ko SC, Chung LW, Kondo S. Combination therapy of malignant glioma cells with 2-5A-antisense telomerase RNA and recombinant adenovirus p53. *Gene Ther*, 7:2071-2079,2000.
3. Andrews DW, Resnicoff M, Flanders AE, Kenyon L, Curtis M, Merli G, Baserga R, Iliakis G, Aiken RD. Results of a pilot study involving the use of an antisense oligodeoxynucleotide directed against the insulin-like growth factor type I receptor in malignant astrocytomas. *J Clin Oncol*, 19:2189-2200, 2001.
4. Jansen B, Wacheck V, Heere-Ress E, Schlagbauer-Wadl H, Hoeller C, Lucas T, Hoermann M, Hollenstein U, Wolff K, Pehamberger H. Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy. *Lancet*, 356:1728-1733, 2000.
5. Nielsen PE, Peptide nucleic acid targeting of double-stranded DNA, *Methods Enzymol*, 340:329-340,2001.
6. Summerton J, Weller D. Morpholino antisense oligomers: Design, preparation and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 7:187-195, 1997.
7. Lacerra G, Sierakowska H, Carestia C, Fucharoen S, Summerton J, Weller D, Kole R. Restoration of hemoglobin A synthesis in erythroid cells from peripheral blood of thalassemic patients. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:9591-9596,2000.
8. Taylor MF, Paulauskis JD, Weller DD, Kobzik L. Comparison of efficacy of antisense oligomers directed toward TNF- α in helper T and macrophage cell lines. *Cytokine*, 9:672-681, 1997.
9. Arora V, Knapp DC, Smith BL, Stadtfield ML, Stein DA, Reddy MT, Weller DD, Iversen PL. c-Myc antisense limits rat liver regeneration and indicates role for c-myc in regulating cytochrome P-450 3A activity. *J Pharmacol Exp Ther*, 292:921-928,2000.
10. Shi N, Boado RJ, Pardridge WM. Antisense imaging of gene expression in the brain in vivo. *Proc Natl Acad. Sci USA*, 97:14709-14714, 2000.
11. Boado RJ, Kazantsev A, Apostol BL, Thompson LM, Pardridge WM. Antisense-mediated down-regulation of the human huntingtin gene. *J Pharmacol Exp Ther*, 295:239-243, 2000.
12. Tanabe K, Kim R, Inoue H, Emi M, Uchida Y, Toge T. Antisense Bcl-2 and HER-2 oligonucleotide treatment of breast cancer cells enhances their sensitivity to anticancer drugs. *Int J Oncol*, 22:875-81, 2003.
13. Cho YS, Cho-Chung YS. Antisense protein kinase A R1alpha acts synergistically with hydroxycamptothecin to inhibit growth and induce apoptosis in human cancer cells: molecular basis for combinatorial therapy. *Clin Cancer Res*, 9:1171-1173, 2003.
14. Tortora G, Caputo R, Damiano V, Caputo R, Troiani T, Veneziani BM, De Placido S, Bianco AR, Zangemeister-Wittke U, Ciardiello F. Combined targeted inhibition of bcl-2, bcl-XL, epidermal growth factor receptor, and protein kinase A type I causes potent antitumor, apoptotic, and antiangiogenic activity. *Clin Cancer Res*, 9:866-871,2003.

15. Jiang Z, Zheng X, Rich KM. Down-regulation of bcl-2 and bcl-XL expression with bispecific antisense treatment in glioblastoma in vitro induce to enhance caspase-dependent cell death. *J Neurochem*, 84:273-281, 2003.
16. Mycek MJ, Harvey RA, Champe, PC. *Pharmacology*. Lippincott-Raven, 2nd ed., 1997 Philadelphia, New York, pp.475.
- 5 17. Park JW. "Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment." *Breast Cancer Res.*; 4:95-99(2002).
18. Matsukado K, Sugita M, Black KL. Intracarotid low dose bradykinin infusion selectively increases tumor permeability through activation of bradykinin B2 receptors in malignant gliomas. *Brain Res*, 792:10-15, 1998.
19. Ningaraj NS, Rao MK, Black KL. Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channel-mediated blood-brain tumor barrier permeability increase in a rat brain tumor model. *Cancer Res*, 63:8899-8911, 2003.
- 10 20. Torchilin VP, Lukyanov AN. "Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges and solutions." *Drug Discov Today*; 8:259-66,2003.
21. Peterson CM, Shiah J., Sun Y, Kopeckova P, Minko T, Straight RC, Kopecek J "HPMA copolymer delivery of chemotherapy and photodynamic therapy in ovarian cancer." *Adv Exp Med Biol.*; 519:101-23, 2003.
- 15 22. Maeda H, Fang J., Inutsuka T, Kitamoto Y. "Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications." *Int Immunopharmacol.*; 3:319-28,2003.
23. Satchi-Fainaro R, Puder M, Davies JW, Tran HT, Sampson DA, Greene AK, Corfas G, Folkman J. Targeting angiogenesis with a conjugate of HPMA copolymer and TNP-470. *Nat Med*, 10:255-261,2004.
24. Fischer H, Erdmann S, Holler E. An unusual polyanion from *Physarum polycephalum* that inhibits homologous DNA polymerase α in vitro. *Biochemistry*, 28:5219-5226, 1989.
- 20 25. Lee BS, Holler E. Effects of culture conditions on β -poly(1-malate) production by *Physarum polycephalum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51:647-652, 1999.
26. Korherr C, Roth M, Holler E. Poly(β -1-malate) hydrolase from plasmodia of *Physarum polycephalum*. *Can J Microbiol.* 41(Suppl. 1):192-199, 1995.
- 25 27. Lee BS, Vert M, Holler E. Water-soluble aliphatic polyesters: poly(malic acid)s, in: *Biopolymers Vol 3a* (Doi Y, Steinbüchel A, eds) pp 75-103, Wiley-VCH, New York, 2002.
28. Gasslmaier B, Holler E. Specificity and direction of depolymerization of β -poly(1-malate) catalysed by polymalatease from *Physarum polycephalum*. Fluorescence labeling at the carboxy-terminus of β -poly(1-malate). *Eur J Biochem*, 250:308-314, 1997.
- 30 29. Gasslmaier B, Krell CM, Seebach D, Holler E. Synthetic substrates and inhibitors of β -poly(1-malate)-hydrolase (polymalatease). *Eur J Biochem.* 267:5101-5105, 2000.
30. Barbaud C, Renard E, Langlois V, Guérin Ph. Novel macromolecules and supr-molecular materials for drug delivery. Natural and artificial hydrolyzable polyesters with functionalized side chains for bioactive molecular encapsulation. *J Controlled Release*, 72:225-309, 2001.
- 35 31. Braud C, Bunel C, Vert M. Poly(β -malic acid): a new polymeric drug-carrier. Evidence for degradation in vitro. *Polym Bull*, 13:293-299,1985.
32. Cammas S, Béar M-M, Moine L, Escalup R, Ponchel G, Kataoka K, Guérin Ph. Polymers of malic acid and 3-alkylmalic acid as synthetic PHAs in the design of biocompatible hydrolyzable devices. *Int J Biol Macromol*, 25:273-282, 1999.
- 40 33. Pichon C, Goncalves C, Midoux P. Histidine-rich peptides and polymers for nucleic acid delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 53:75-94, 2001.
34. Khazenzon NM, Ljubimov AV, Lakhter AJ, Fujiwara H, Sekiguchi K, Sorokin LM, Virtanen I, Black KL, Ljubimova JY. Antisense inhibition of laminin-8 expression reduces invasion of human gliomas in vitro. *Mol Cancer Ther* 2003, 2:985-994.
- 45 35. Boado RJ, Tsukamoto H, Pardridge WM. Drug delivery of antisense molecules to the brain for treatment of Alzheimer's disease and cerebral AIDS. *J Pharm Sci*, 87: 1308-1315, 1998.
36. Shi N, Pardridge WM. Noninvasive gene targeting to the brain. *Proc Natl Acad Sci*, 97:7567-7572,2000.

37. Kurihara A, Deguchi Y, Pardridge WM. Epidermal growth factor radiopharmaceuticals: ¹¹¹In chelation, conjugation to a blood-brain barrier delivery vector via a biotin-polyethylene linker, pharmacokinetics, and in vivo imaging of experimental brain tumors. *Bioconjugate Chem*, 10:505-511, 1999.
- 5 38. Bickel U, Yoshikawa T, Pardridge WM. Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev*, 46:247-279, 2001.
39. Steinbach JP, Klumpp A, Wolburg H, Weller M. Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling protects human malignant glioma cells from hypoxia-induced cell death. *Cancer Res*, 64:1575-1578, 2004.
40. Duncan,R. 1999. Polymer conjugates for tumor targeting and intracytoplasmic delivery. The EPR effect as a common gateway? *Research Focus* 2:441-449.
- 10 41. Seymour,LW, Miyamoto,Y, Maeda,H, Brereton,M, Strohalm,J, Ulbrich,K, Duncan,R. 1995. Influence of molecular weight on passive tumor accumulation of a soluble macromolecular drug carrier. *Eur.J.Cancer* 31A:766-770.
42. Kopecek, J., Kopeckova, P., Minko, T., Lu, Z. 2000. HPMA copolymer-anticancer drug conjugates:design, activity, and mechanism of action. *Eur. J. Biopharm.* 50: 61-81.
- 15 43. Vincenzi, V., Ferruti, P., Ford, J., Duncan, R. 2001. Synthesis and preliminary evaluation of novel functionalized poly(ethylene glycol)-block-poly(ester-carbonate) copolymers as biodegradable carriers. *Macromolecular Bioscience* 1: 164-169.
44. Environmental health criteria 191. Acrylic acid. United Nations Environmental Programme / International Labour Organisation / World Health Organisation. International Programme on Chemical Safety. <http://www.inchem.org/documents/ehe/ehc/ehc191.htm>.
- 20 45. Li, C. 2002a. Poly(L-glutamic acid)-anticancer drug conjugates. *Advanced Drug Delivery*. 54:695-713.
46. Gill, T.J., Kunz, H.W., Papermarker, D.S. 1967. Studies on synthetic polypeptide analogues. *J. Biol. Chem.* 242:3306-3318.
47. Chiang, C.-H., Yeh, M,-K. 2003. Contribution of poly(amino acids) to advances in pharmaceutical biotechnology. *Current Pharmaceut. Biotechnol.* 4: 8-16.
- 25 48. Angerer, B., Holler, E. 1995. Large complexes of β -poly(L-malate) with DNA polymerase α , histones, and other proteins in nuclei of growing plasmodia of *Physarum polycephalum*. *Biochemistry*. 34: 14741-14751.
49. Abdellaoui,K, Boustta,M, Vert,M, Morjani,H, Manfait,M. 1998. Metabolite-derived artificial polymers designed for drug targeting, cell penetration and bioresorption. *Eur.J.Pharmaceutical Sciences* 6:61-73.
- 30 50. Ljubimova, J. Y., Lakhter, A. J., Loksh, A., Yong, W. H., Riedinger, M. S., Miner, J. H., Sorokin, L. M., Ljubimov, A. V., and Black, K. L. (2001) Overexpression of α 4 chain-containing laminins in human glial tumors identified by gene microarray analysis. *Cancer Research* 61, 5601.
51. Bulmus,V, Woodward,M, Lin,L, Murthy,NSP, Hoffman,A. 2003. A new pH-responsive and glutathione-reactive, endosomal membrane-siruptive polymeric carrier for intracellular delivery of biomolecular drugs. *J Controlled Release* 93:105-120.
- 35 52. Saito,G, Swanson,JA, Lee,K-D. 2003. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55:199-215.
53. Lee,JH, Engler,JA, Collawn,F, Moore,BA. 2001. Receptor mediated uptake of peptides that bind the human transferrin receptor. *Eur.J.Biochem.* 268:2004-2012.
- 40 54. Kovar,M, Strohalm,J, Ulbrich,J, Brihova,B. 2002. In vitro and in vivo effect of HPMA copolymer-bound doxorubicin targeted to transferrin receptor of B-cell lymphoma 38C13. *J.Drug Targeting* 10:23-30.
55. Broadwell,RD, Baker-Cairns,BJ, Friden.P.M., Oliver,C, Villegas,JC. 1996. Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium and endothelium. III Receptor-mediated transcytosis through the blood-brain-barrier of blood-borne transferrin and antibody against the transferrin receptor. *Exp.Neurol.* 142:47-65.
- 45 56. Friden,PM. 1996. Utilization of an endogenous cellular transport system for the delivery of therapeutics across the blood-brain barrier. *J.Controlled Release* 46:117-128.
57. van Gelder,W, Cleton-Soeteman,MI, Huijskes-Heins,MIE, van Run,PRWA, van Eijk,HG. 1997. Transcytosis of 6.6-nm gold-labeled transferrin: an unltrastructural study in cultured porcine blood-brain barrier endothelial cells. *Brain Research* 746:105-116.

58. Li,H, Qian,ZM. 2002b. Transferrin/Transferrin receptor-mediated drug delivery. *Medical Research Reviews* 22:225-250.
59. Lee,HJ, Engelhardt,B, Lesley,J, Bickel,U, Pardridge,WM. 2000. Targeting rat anti-mouse transferrin receptor mAb through BBB in mouse. *J.Pharmacol.Exp.Therapeut.* 292:1048-1052.
- 5 60. Friden,PM, Walus,LRMGF, Taylor,MA, Malfroy,B, Starzyk,RM. 1991. Anti-transferrin receptor antibody and antibody-drug conjugates cross the blood-brain barrier. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:4771-4775.
61. Zhang,Y, Zhang,Y, Bryant,J, Charles,A, Boado,RJ, Pardridge,WM. 2004. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clinical Cancer Research* 10:3667-3677.
- 10 62. Lackey,CA, Press,OW, Hoffman,ASSPS. 2002. A biomimetic pH-responsive polymer directs endosomal release and intracellular delivery of an endocytosed antibody complex. *Bioconjugate Chem.* 13:996-1001.
63. Arpicco,S, Dosio,F, Bolognesi,A, Lubelli,C, Brusa,P, Stella,B, Ceruti,M, Cattel,L. 2002. Novel poly(ethylene glycol) derivatives for preparation of ribosome-inactivating protein conjugates. *Bioconjugate Chem.* 13:757-765.
- 15 64. Maruyama,K, Takahashi,N, Kazuhiro,T, Nagaike,K, Iwatsuru,M. 1997. Immunoliposomes bearing polyethyleneglycol- coupled Fab' fragment show prolonged circulation time and high extravasation into targeted solid tumors. *FEBS Letters* 413:177-180.
65. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- 20 66. Johnson, J. F. (1985) Size-exclusion chromatography. *Encyclopedia of polymer science and engineering*, Vol. 3, 501-523.
67. Devlin, T.M. 1997. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. pp. 28-29. Wiley & Sons, INC. New York, USA.
68. Foulon,CF, Bigner,DD, Zalutsky,MR 1999. Preparation and characterization of anti-tenascin monoclonal antibody- streptavidin conjugates for pretargeting applications. *Bioconjugate Chem.* 10:867-876.
- 25 69. Iwata,H, Matsuda,S, Mitsuhashi,K, Itoh,E, Ikada,Y. 1998. A novel surgical glue composed of gelatin and Nhydroxysuccinimide activate poly(L-glutamic acid): Part 1. Synthesis of activated poly(L-glutamic acid) and its gelation with gelatin. *Biomaterials* 19:1869-1876.
70. Juszczak,L, Manjula,B, Bonaventura,C, Acharya,A, Friedman,JM. 2002. UV Resonance Raman study of fb93-modified hemoglobin A: Chemical modifier-specific effects and added influences of attached poly(ethylene glycol) chains. *Biochemistry* 41:376-385.
- 30 71. Schnaible,V, Przybylski,M. 1999. Identification of fluorescein-5'-isothiocyanate-modification sites in proteins by electrospray-ionization mass spectroscopy. *Bioconjugate Chem.* 10:861-866.
72. Willner,D, Train,PA, Hofstaed,SJ, King,HD, Lasch,DJ, Braslawsky,GR, Greenfield,RS, Kaneko,T, Firestone,RA. 1993. (6-Maleimidocaproyl)hydrazone of Doxorubicin - a new derivative for the preparation of immunoconjugates of doxorubicin. *Bioconjugate Chem.* 1993:521-527.
- 35 73. Fournié Ph, Domurado D, Guérin Ph, Braud C, Vert M, Pontikis R. In vivo fate of repeat-unit-radiolabelled poly(β -malic acid), a potential drug carrier. *J Bioactive Compatible Polymers* 7: 113-129, 1992.
74. Roufai MB, Midoux P. Histidylated polylysine as DNA vector: Elevation of the imidazole protonation and reduced cellular uptake without change in the polyfection efficiency of serum stabilized negative polyplexes. *Bioconjugate Chem*, 12: 92-99, 2001.
- 40 75. Bennis JM, Choi JS, Mahato RI, Park JS, Kim SW. pH-sensitive cationic polymer gene delivery vehicle: N-Ac-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) comb shaped polymer. *Bioconjugate Chem*, 11:637-645,2000.
76. Ulbrich K, Subr V, Strohalm J, Plocova D, Jelinkova M, Rihova B. Polymeric drugs based on conjugates of synthetic and natural macromolecules: I. Synthesis and physico-chemical characterisation. *J Control Release*, 64: 63-79, 2000.
- 45 77. Bartus RT, Elliott PJ, Dean RL, Hayward NJ, Nagle TL, Huff MR, Snodgrass PA, Blunt DG. Controlled modulation of BBB permeability using the bradykinin agonist, RMP-7. *Exp Neurol*, 142: 14-28, 1996.
78. Howl J. Fluorescent and biotinylated probes for B2 bradykinin receptors: Agonist and antagonists. *Peptides*, 20: 515-518, 1999.

79. Campa MJ, Kuan CT, O'Connor-McCourt MD, Bigner DD, Patz. Jr EF. Design of a novel small peptide targeted against a tumor-specific receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 275: 631-636,2000.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de administración del fármaco que comprende:
- poli (ácido β -L-málico) que tiene una pluralidad de grupos de ácido carboxílico libres;
- 5 una pluralidad de módulos moleculares biológicamente activos, cada uno de los cuales está unido covalentemente a los grupos de ácido carboxílico libres, en el que dichos módulos activos comprenden:
- un módulo de direccionamiento para promover la captación por una célula diana, el módulo de direccionamiento que comprende un anticuerpo contra el receptor de la transferrina;
- un módulo profármaco para alterar el metabolismo celular de la célula diana, el módulo profármaco que comprende un oligonucleótido antisentido;
- 10 L-leucina, L-valina, o una combinación de las mismas, unidas a través de enlaces amida para proporcionar lipofilia dependiente del pH; y
- un módulo de polietilenglicol (PEG) de cadena larga para la protección contra la degradación.
2. La molécula de administración del fármaco según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo contra el receptor de la transferrina es para la selección de células cancerosas y la endocitosis mediada por receptor.
- 15 3. La molécula de administración del fármaco según la reivindicación 1 o 2, en la que el oligonucleótido antisentido es un fármaco antitumoral.
4. La molécula de administración del fármaco según la reivindicación 1, que comprende L-leucina acoplada a un polietilenglicol (PEG) de cadena corta y L-valina directamente acoplada, ambas unidas a través de enlaces amida.
- 20 5. La molécula de administración del fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la pluralidad de módulos incluye además un módulo indicador para determinar la captación celular de la molécula de administración del fármaco, en la que el módulo indicador comprende una molécula fluorescente.
6. La molécula de administración del fármaco según la reivindicación 5, en la que el indicador comprende fluoresceína o Cy5.
- 25 7. La molécula de administración del fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
8. La molécula de administración del fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o quimérico.
9. La molécula de administración del fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el módulo de profármaco está unido al poli (ácido β -L-málico) por un enlace escindible que se escinde en el citoplasma de una
- 30 célula.
10. La molécula de administración del fármaco según la reivindicación 9, en la que el enlace escindible es un enlace disulfuro.
11. La molécula de administración del fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido antisentido morfolino.
- 35 12. La molécula de administración del fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el oligonucleótido antisentido interfiere con la producción de laminina-8.
13. La molécula de administración del fármaco según la reivindicación 12, en la que el oligonucleótido antisentido interfiere con la producción de laminina-8 al alterar la producción de una subunidad de laminina seleccionada del grupo que consiste en laminina α 4 y laminina β 1.
- 40 14. La molécula de administración del fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para uso en el tratamiento de células tumorales.

Fig. 1a

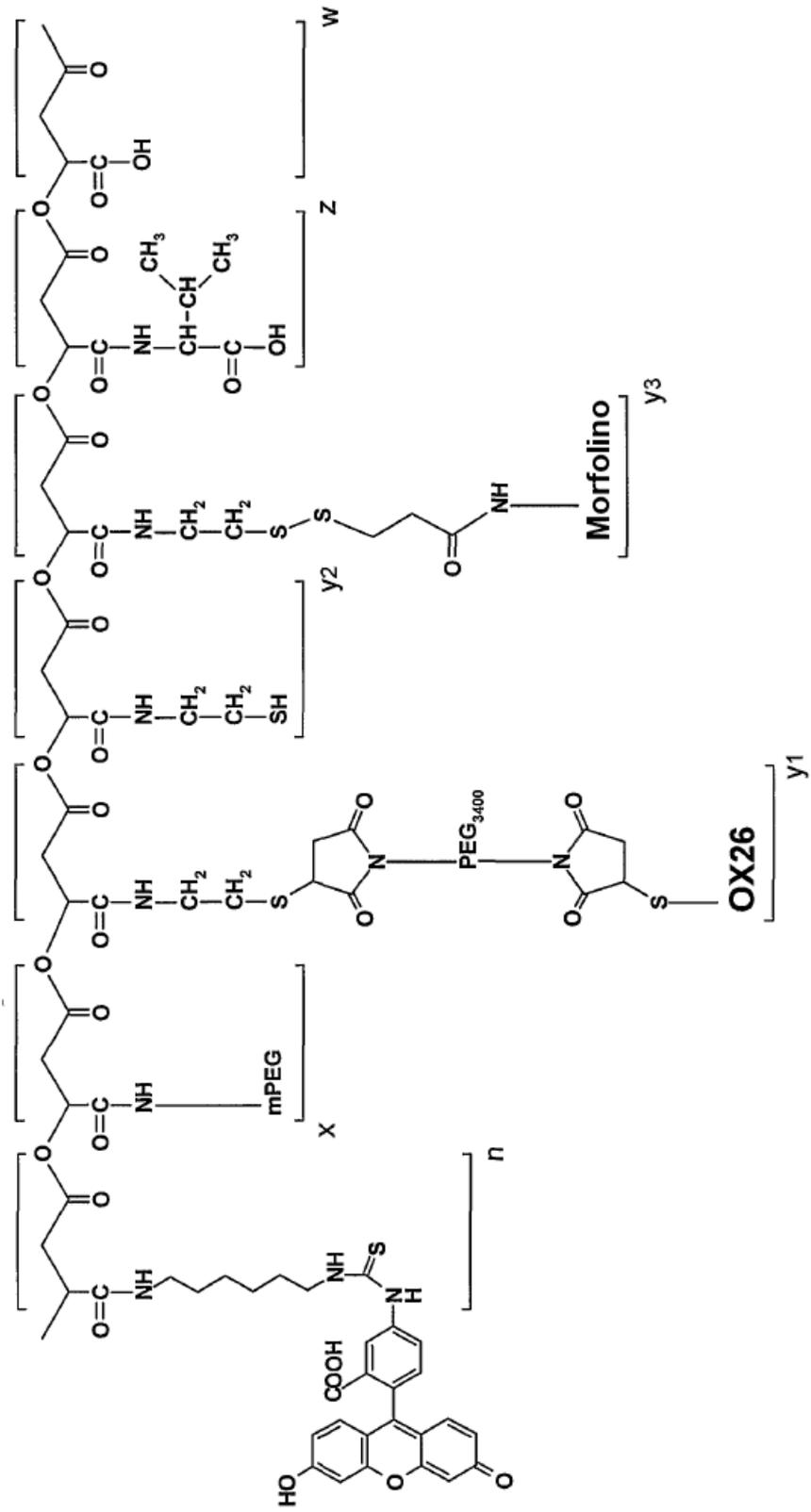


Fig. 1b

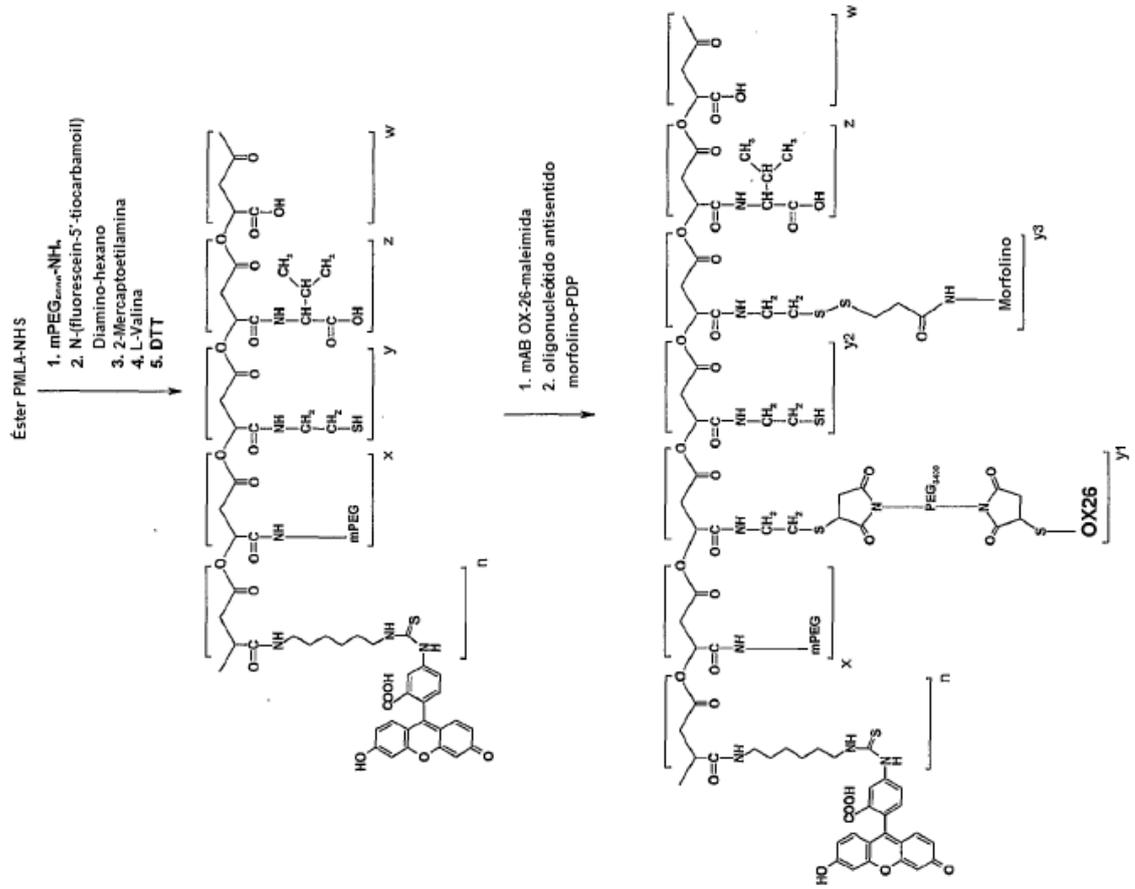


Fig. 2

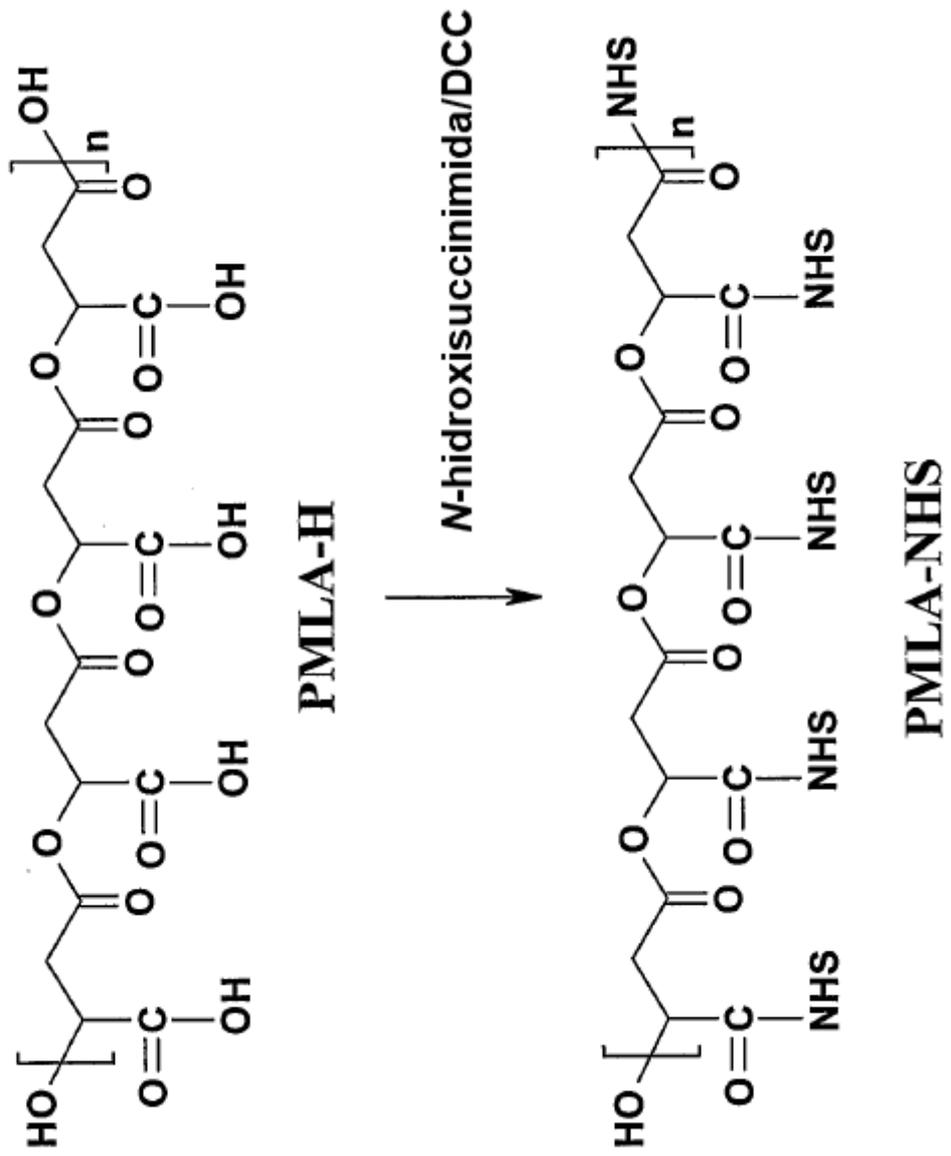
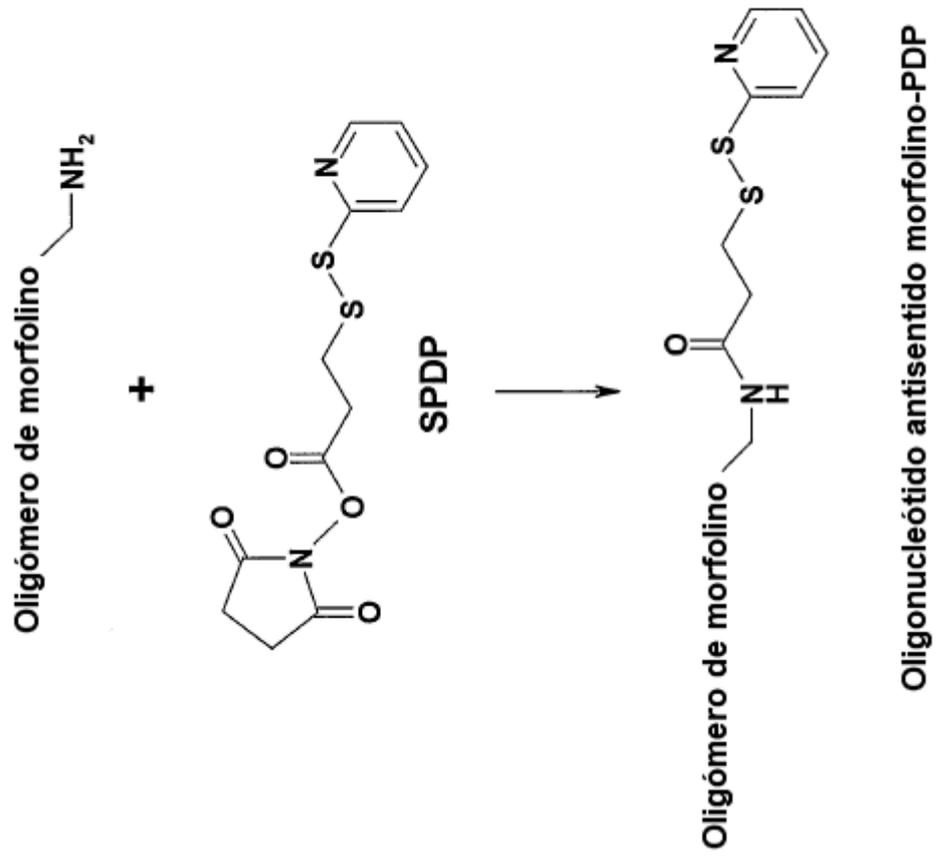


Fig. 3



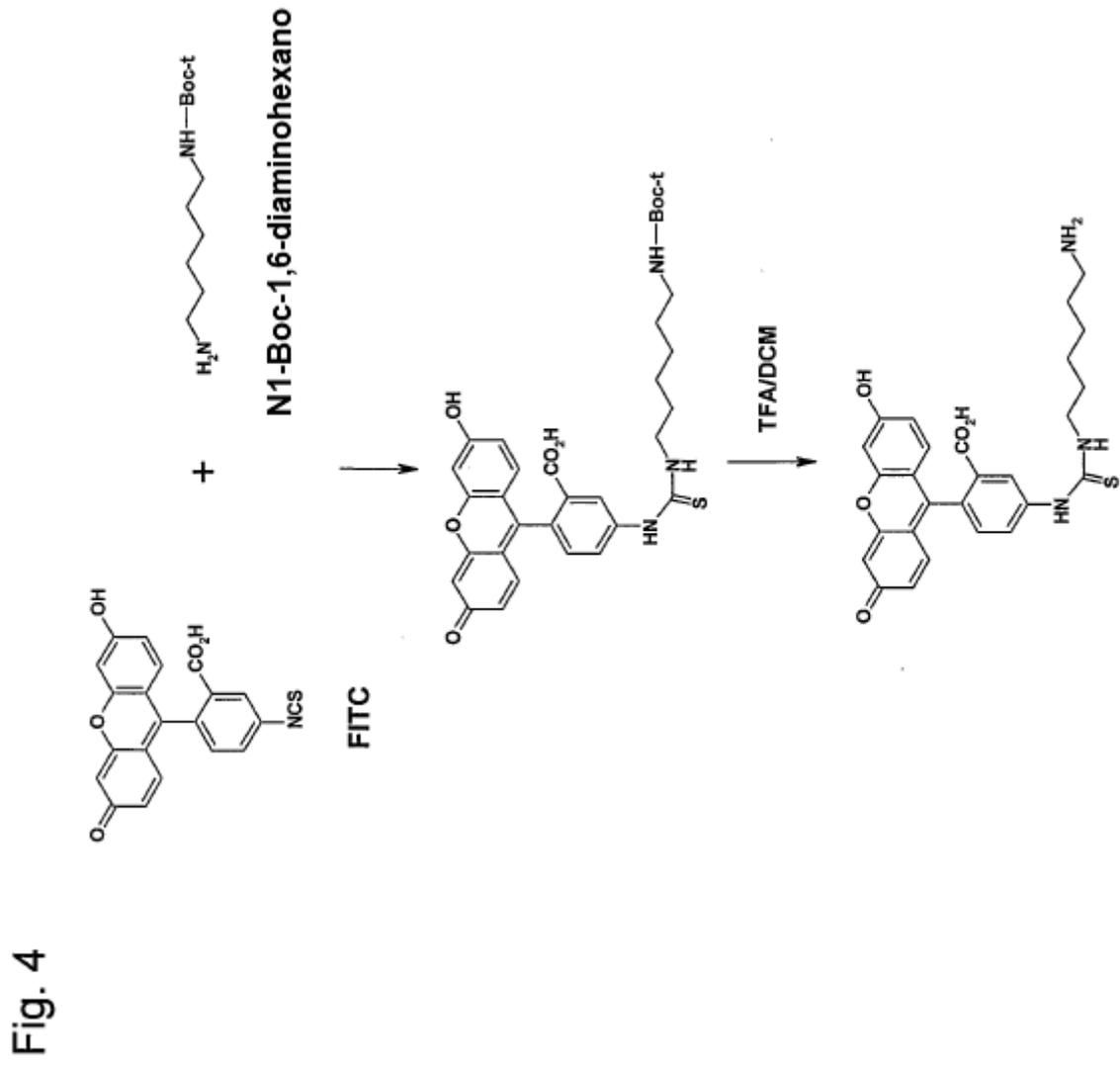


Fig. 5

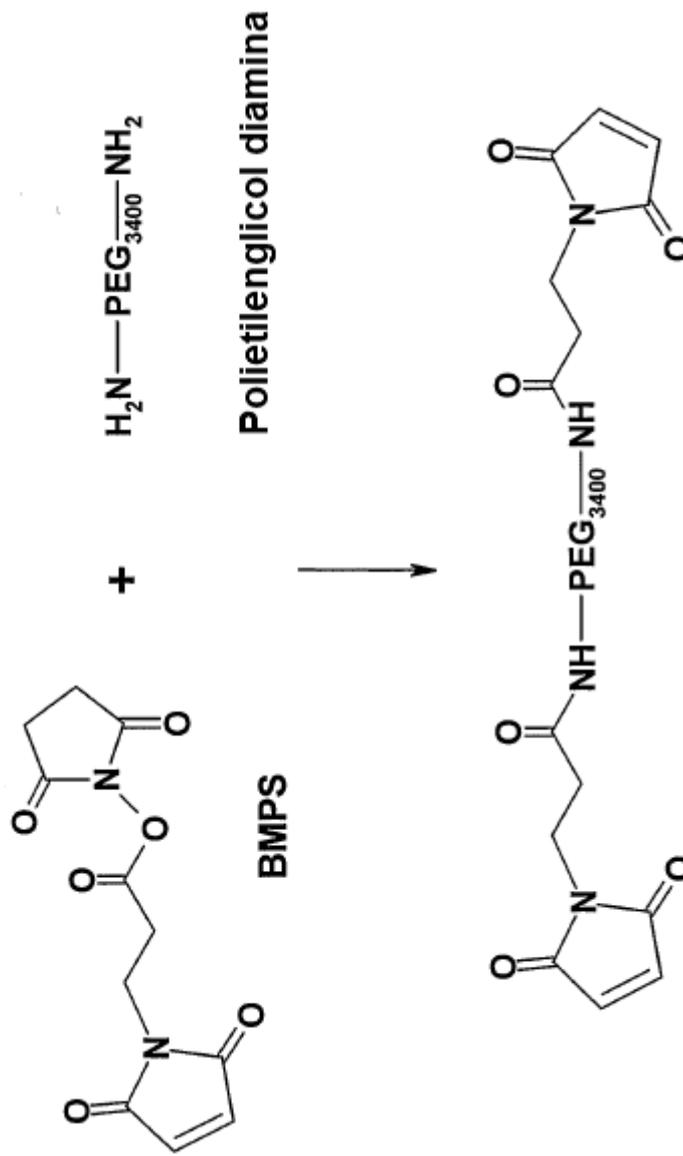


Fig. 6

Éster PMLA-NHS

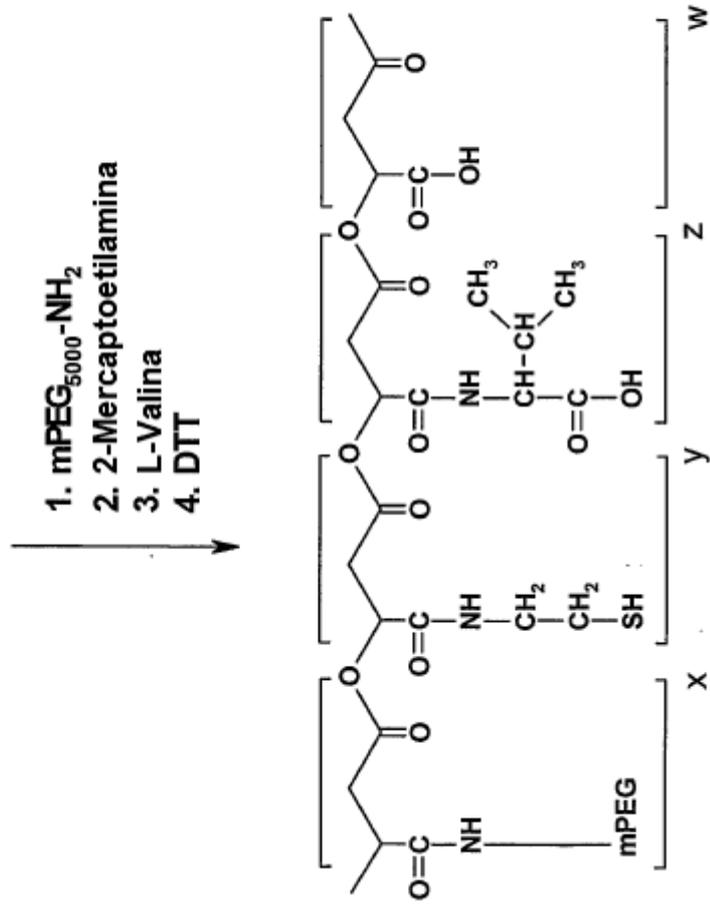


Fig. 7

Conjugado PMLA/L-valina/2-mercaptoetilamina/mPEG₅₀₀₀-NH₂

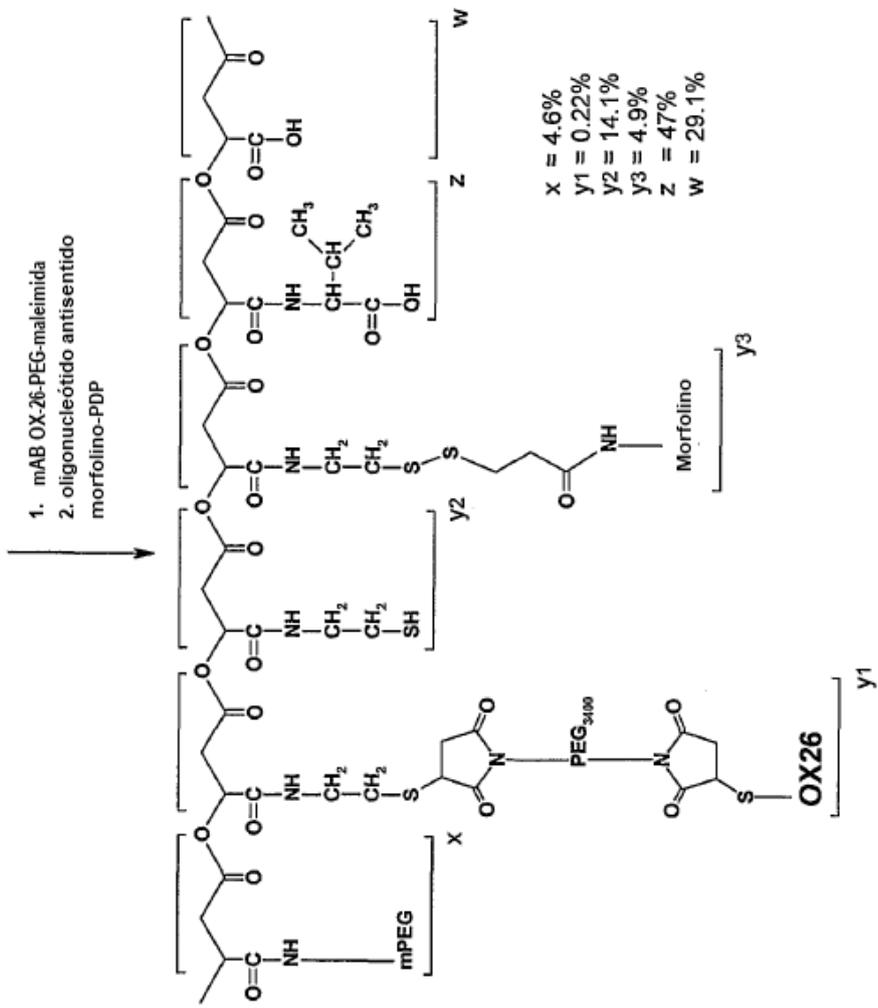


Fig. 8

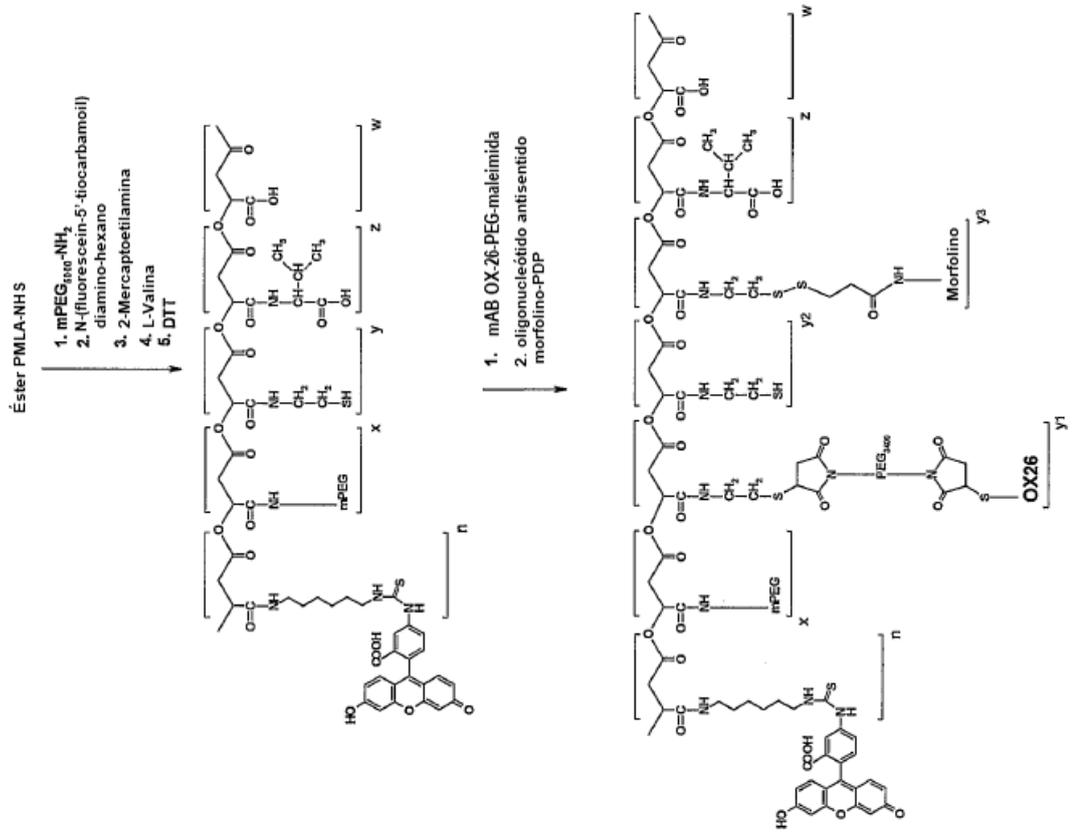


Fig. 9

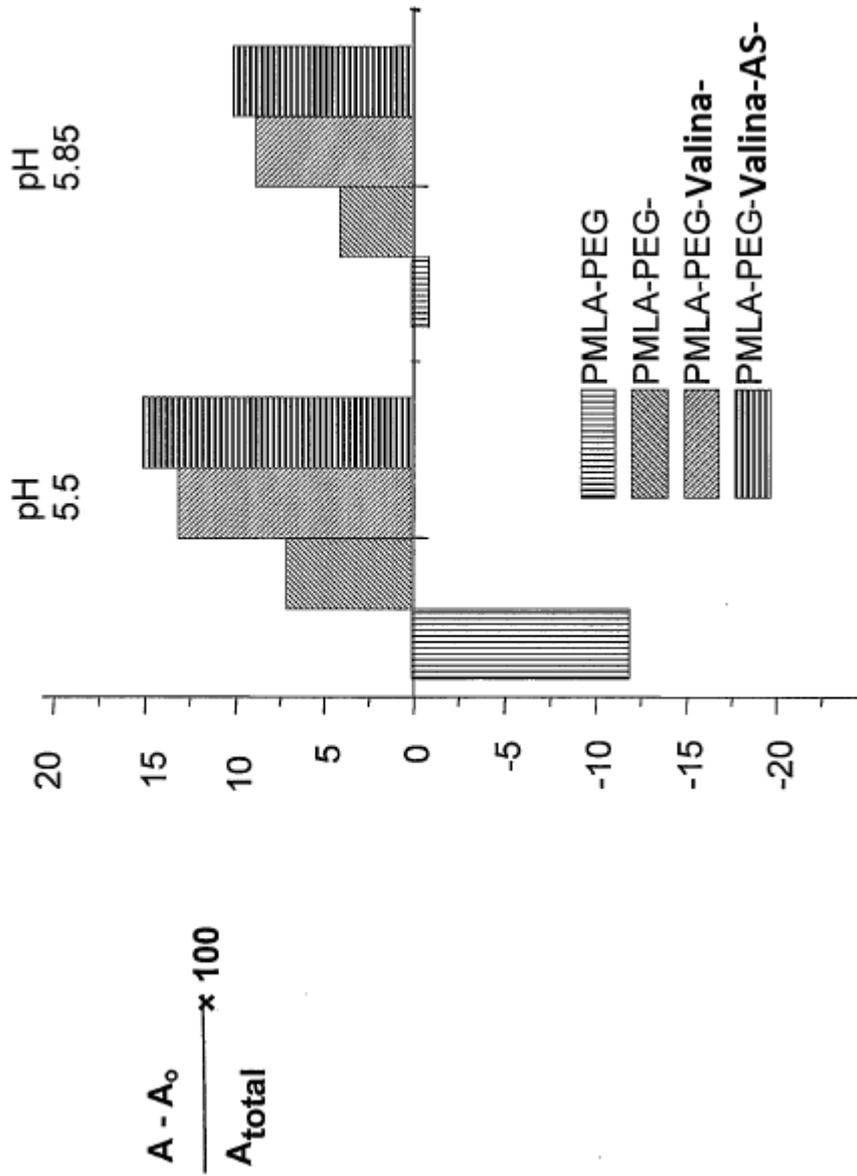


Fig. 10a

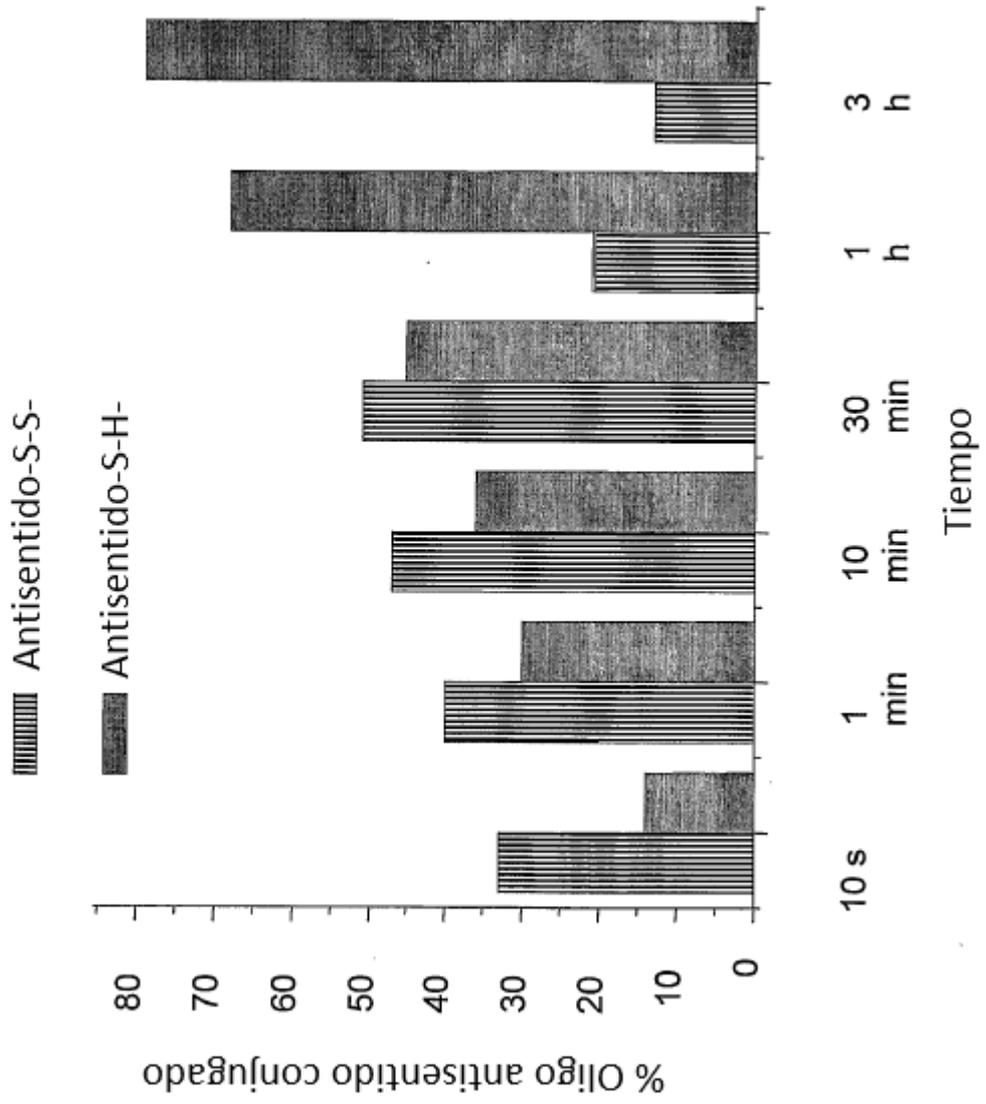
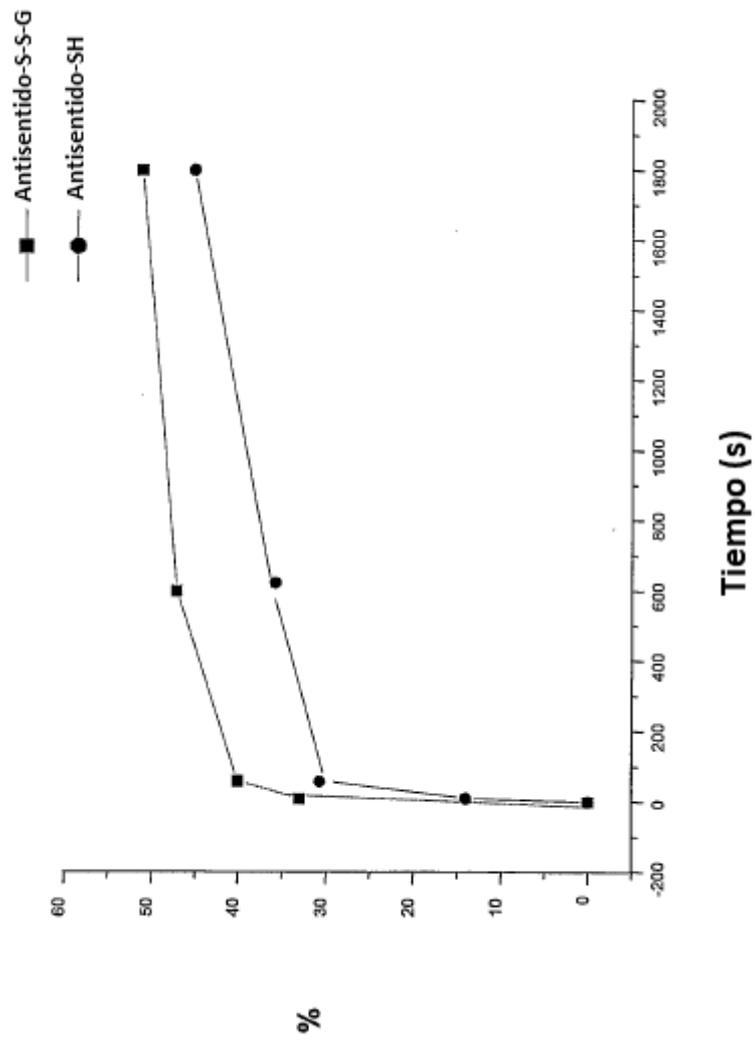


Fig. 10b



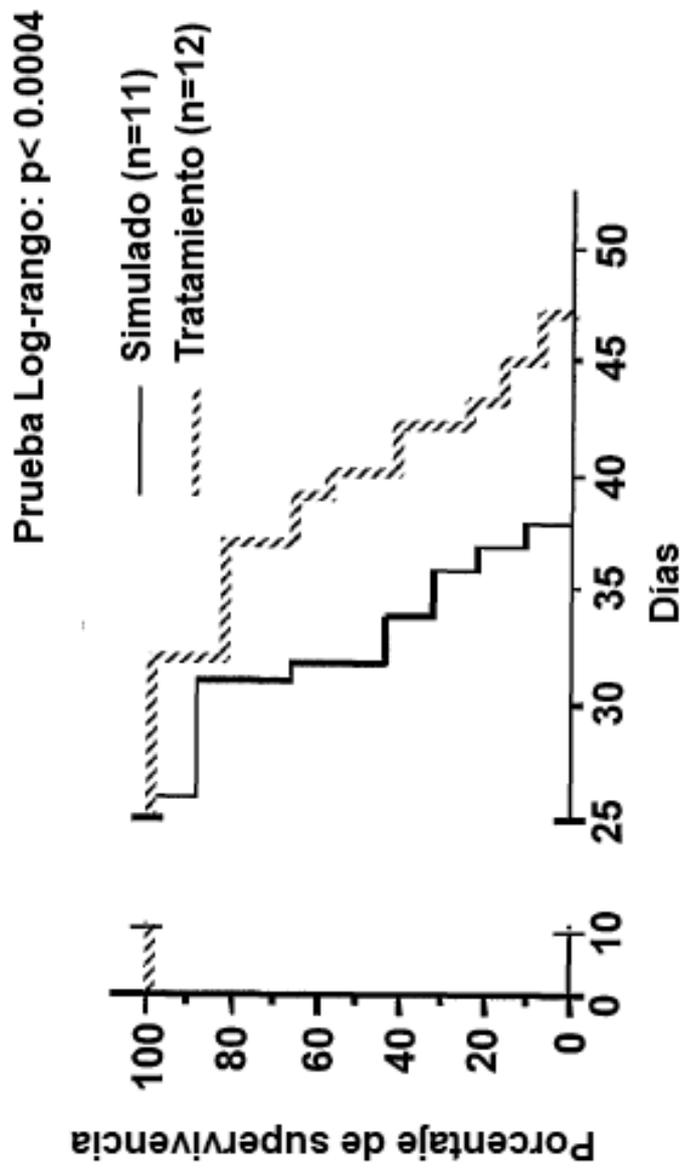


Fig. 11

Fig. 12

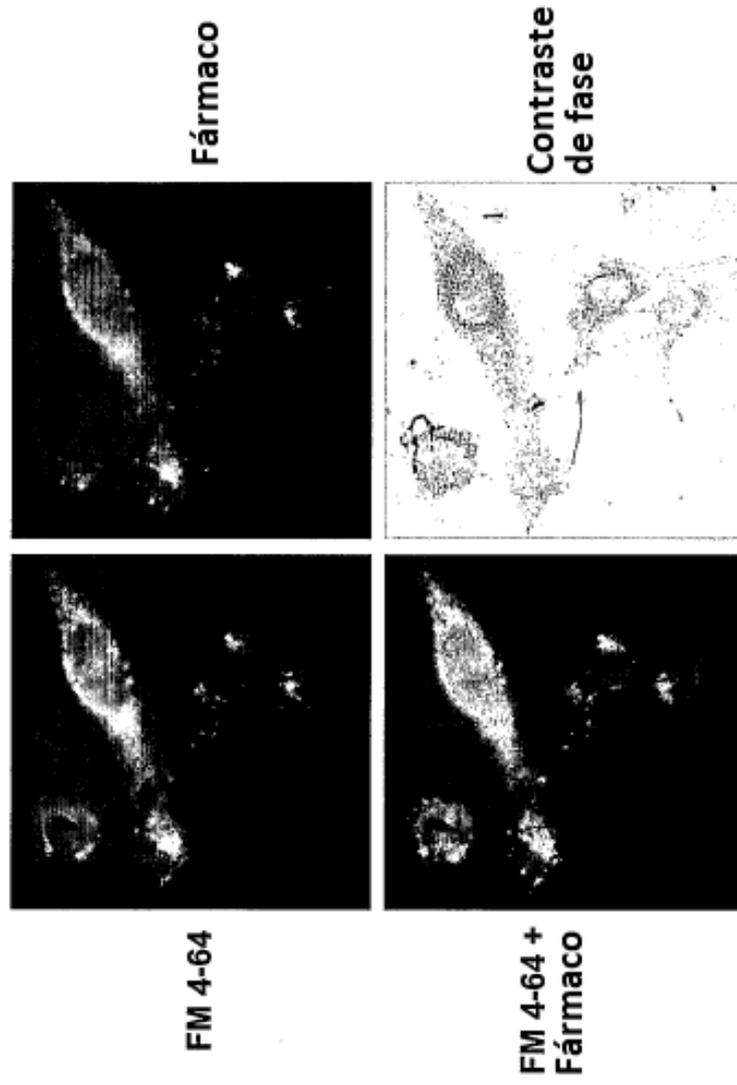
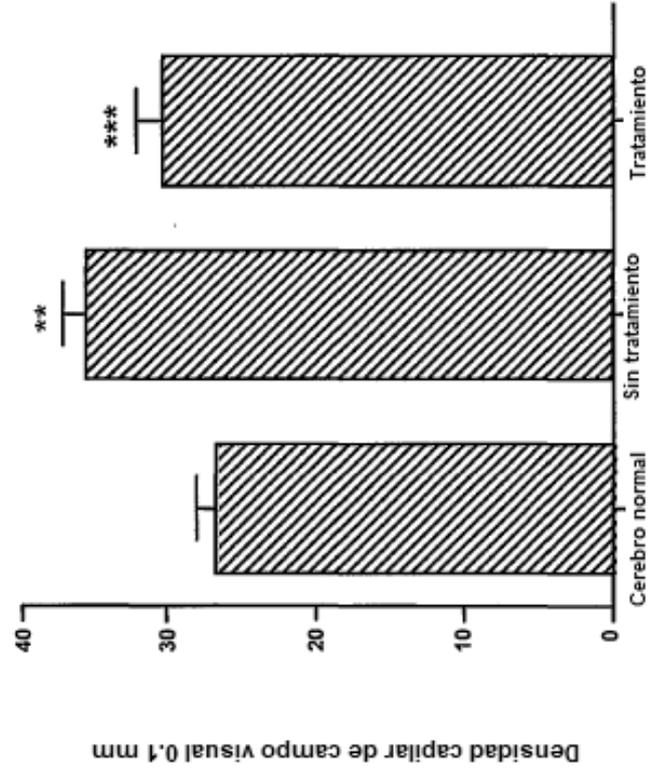


Fig. 13

Disminución del 55% de la densidad capilar en grupo tratado con fármaco



** , p<0.001 Sin tratamiento vs. Cerebro normal ; *** , p<0.001 Sin tratamiento vs. Tratamiento

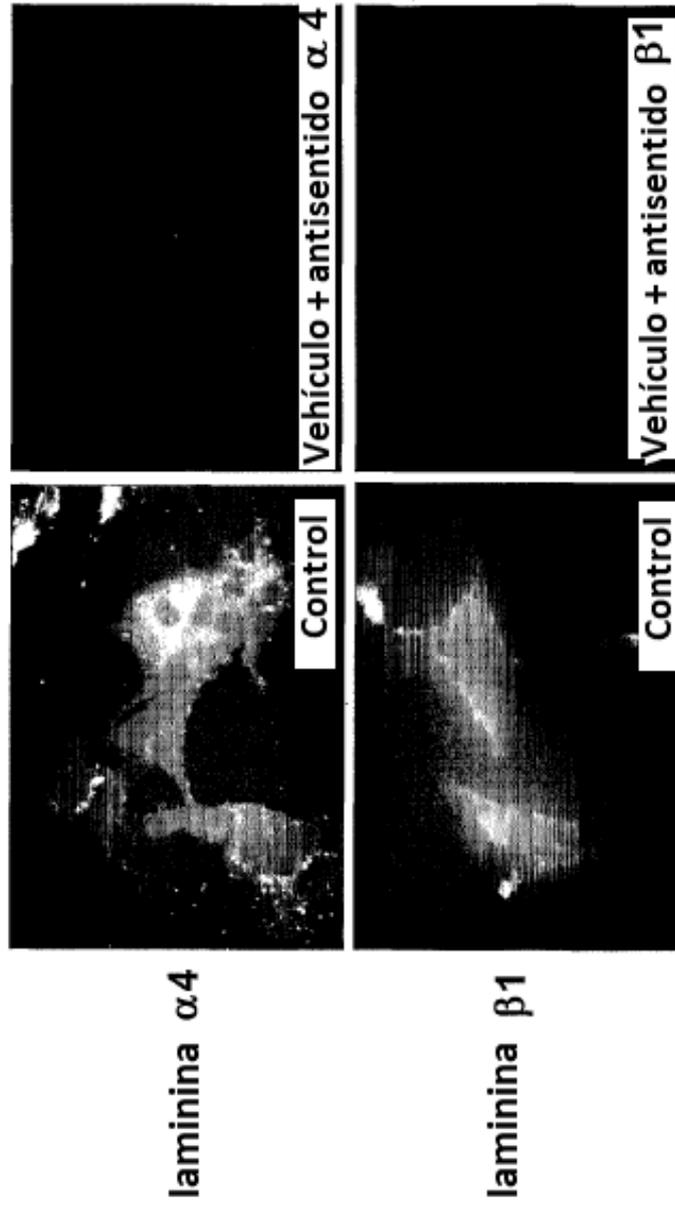
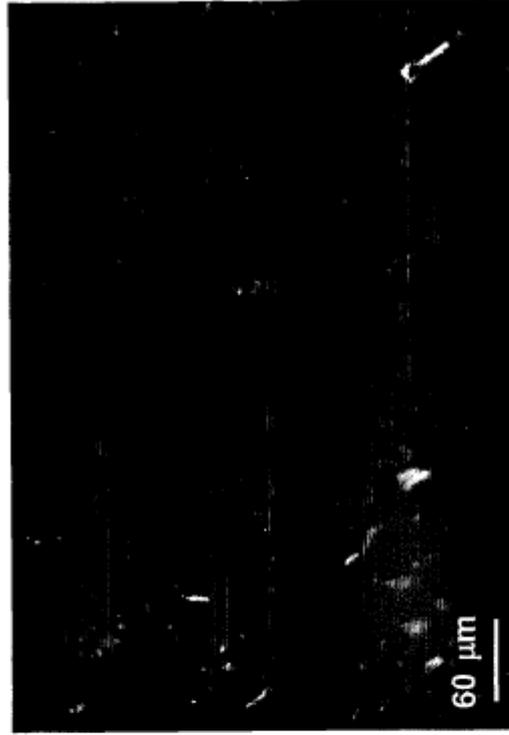


Fig. 14

laminina $\beta 1$



tumor sin tratar



tumor tratado con fármaco 2

Fig. 15

Fig. 16

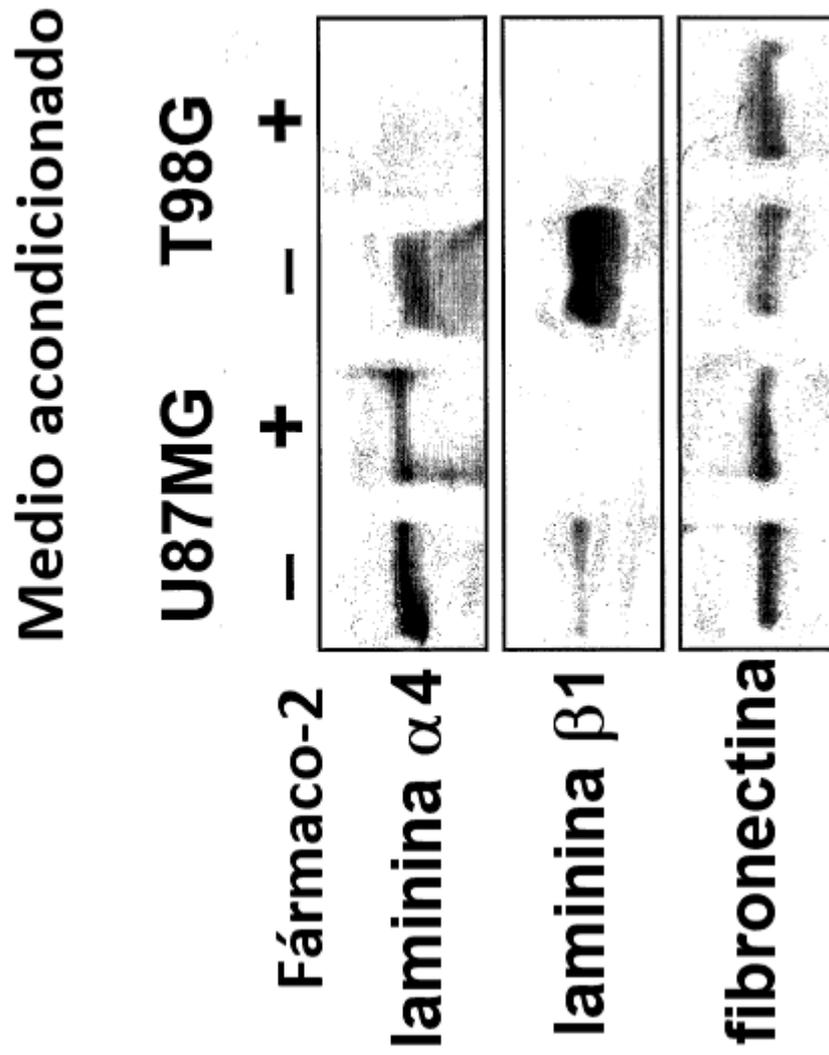
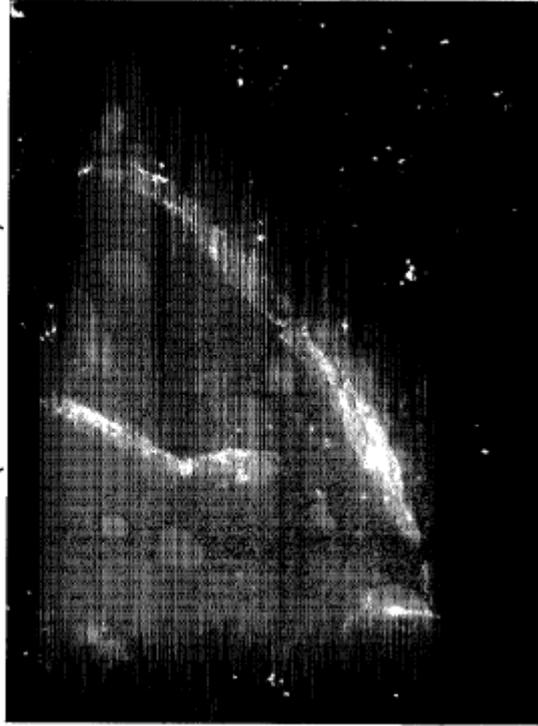


Fig. 17

Tumor U87MG
(en cerebro de rata)



Cerebro de rata normal

