

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 225**

51 Int. Cl.:

A61K 47/69 (2007.01)

A61K 47/54 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.02.2010 PCT/NL2010/050082**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.08.2010 WO10095940**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2010 E 10705204 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2398500**

54 Título: **Sistema de administración de fármacos a base de glutatión**

30 Prioridad:

20.02.2009 US 154083 P

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

23.10.2019

73 Titular/es:

**2-BBB MEDICINES B.V. (100.0%)
J.H. Oortweg 19, 2F, Room 2213
2333 CH Leiden, NL**

72 Inventor/es:

GAILLARD, PIETER JAAP

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 728 225 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 a base de glutatión

Campo de la invención

5 [0001] Esta invención se refiere al campo de la administración dirigida de fármacos. La invención se refiere a conjugados de ingredientes farmacéuticos activos, comprendidos en portadores o nanocontenedores, unidos a ligandos de transportadores de glutatión que median la unión específica, la endocitosis o la transcitosis. Estos conjugados se usan preferiblemente en métodos para el tratamiento o la prevención de enfermedades cerebrales.

Antecedentes de la invención

10 [0002] Para funcionar adecuadamente, las neuronas requieren un medio extracelular estrechamente regulado. Este microambiente esencial y bien definido se mantiene localmente por células cerebrales cuidadoras llamadas astrocitos (o astroglia). Para hacer frente a la considerable y variable disimilitud entre la composición de la sangre y el compartimento extracelular del cerebro, el sistema nervioso central (SNC) también está protegido de la circulación sanguínea general por un número de barreras entre la sangre y el SNC, es decir, la barrera hematoencefálica, la barrera entre la sangre y el líquido cefalorraquídeo (LCR), la barrera entre los vasos piales y el LCR, el epéndimo y la glía limitante, y también la barrera entre la sangre y la retina, la barrera entre la sangre y los nervios, la barrera entre la sangre y la médula espinal. La barrera hematoencefálica (BHE) se considera la barrera más importante entre la sangre y el SNC, porque cubre un área superficial 1000 veces mayor cuando se compara con las otras barreras entre la sangre y el SNC. La BHE se caracteriza por una capa celular endotelial única hermética que cubre vasos sanguíneos capilares del SNC. De nuevo, los astrocitos son los principales inductores de las propiedades de la BHE en estas células endoteliales, mediante la proyección de 'pies gliales' sobre los capilares.

25 [0003] En particular, la BHE regula el tráfico de iones (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), agua, nutrientes, metabolitos, neurotransmisores (ácido glutámico, triptófano), proteínas plasmáticas (albúmina, fibrinógeno, inmunoglobulinas), células del sistema inmunitario y también xenobióticos (fármacos) al interior y al exterior del cerebro. El endotelio capilar del cerebro tiene propiedades especiales cuando se compara con los capilares periféricos. Tiene uniones estrechas apretadas, ninguna fenestra, una actividad pinocitótica baja y una membrana basal continua. Las uniones estrechas apretadas resultan en una elevada resistencia eléctrica de 1500-2000 Ohm-cm². Además, las células endoteliales tienen una carga superficial negativa que repele los compuestos cargados negativamente. Tienen muchas mitocondrias y enzimas para descomponer compuestos y varios sistemas de transporte selectivos para transportar activamente nutrientes y otros compuestos hacia dentro y hacia fuera del cerebro. En general, la BHE se puede considerar un órgano que sirve para proteger la homeostasis del cerebro. La BHE, sin embargo, limita así también la administración de xenobióticos (tales como fármacos y agentes de diagnóstico) al cerebro, lo que complica el tratamiento farmacológico tradicional (es decir, dirigido a las neuronas) de los trastornos cerebrales. Es por lo tanto deseable dirigir los fármacos selectivamente al cerebro mediante sistemas de transporte de la BHE endógenos.

40 [0004] Además, para que algunas clases de fármacos alcancen sus objetivos intracelulares, necesitan ser administrados a través de la membrana celular lipofílica, hacia el citoplasma hidrofílico. Este requisito de transporte de lipofílico a hidrofílico constituye un reto para el diseño y la administración de muchos de tales fármacos. La administración de fármacos en una forma no fosforilada, puede mejorar la entrada celular de un fármaco, ya que la membrana celular es poco permeable a los fármacos fosforilados. Posteriormente, el fármaco se puede fosforilar a su forma activa por una timidina quinasa. Sin embargo, la absorción de fármaco ocurrirá de manera no específica por todos los tejidos del cuerpo. Otro inconveniente es que conseguir concentraciones plasmáticas estables del fármaco puede llevar hasta 4 semanas de dosificación. Algunos tratamientos requieren, por ejemplo, la administración diaria de altas dosis (800-1200 mg/día) durante periodos de 24-48 semanas. Esto es demasiado tarde para el tratamiento de enfermedades no crónicas. Otro inconveniente es que tales tratamientos están limitados normalmente por la toxicidad. En conclusión, para muchos tratamientos y terapias hay necesidad de la administración de una cantidad eficaz de fármacos en un periodo de tiempo adecuado en un sitio deseado mientras se minimizan los efectos secundarios. Quizás el reto más grande se encuentre en la administración (a tiempo) de fármacos en sitios protegidos por barreras fisiológicas, tales como el SNC, la retina, la placenta y los testículos.

50 [0005] Aún no hay fármacos para el SNC en el mercado que se dirijan a receptores de captación específicos. Una gran parte de los fármacos comercializados para el tratamiento de trastornos neurológicos (como el derrame cerebral, la migraña y la EM), están de hecho dirigidos a dianas fuera del cerebro (por ejemplo, la vasculatura cerebral o el sistema inmunitario). A diferencia de las moléculas pequeñas, los fármacos biofarmacéuticos son candidatos improbables para modificaciones químicas que aumenten su permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica. Tales compuestos dependen ahora de tecnologías invasivas y perjudiciales para los pacientes,

55

como inyecciones estereotácticas directas y locales, infusiones intratecales e incluso la interrupción (farmacológica) de la barrera hematoencefálica. Debido a las consecuencias neurológicas graves de estas técnicas, estas solo están justificadas en enfermedades seleccionadas potencialmente mortales. Además, las administraciones locales están lejos de ser eficaces en la administración de fármacos por todo el gran cerebro humano. Por tanto, tecnologías de administración de fármacos del SNC innovadoras son muy esperadas.

[0006] El glutatión (GSH) es un antioxidante endógeno. Si la concentración en suero del mismo es insuficiente, pueden ocurrir algunas enfermedades nerviosas, tales como el síndrome de fatiga crónica (SFC). En 1994, Berislav V. Zlokovic aseveró que el GSH llega y pasa a través de la BHE de una cobaya por una vía especial, tal como un transportador de GSH, sin descomposición (1994, Biochem. Biophys. Res. Commun. 201: 402-408). En 1995, Berislav V. Zlokovic aseveró que el GSH existe en las células cerebrales, astrocitos y endoteliales en una concentración milimolar (1995, Pharm. Res. 12: 1395-1406). En 1995, Ram Kannan aseveró que la absorción de GSH depende de la concentración de Na⁺ (1995, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 36: 1785-1792). Si la concentración de Na⁺ es baja, puede inhibirse la absorción de GSH de las células endoteliales del cerebro. También indicó que el transportador de GSH dependiente de sodio situado en el lado luminal de la BHE dirige la absorción de GSH y el transportador de GSH independiente de sodio situado en el lado luminal de la BHE dirige el flujo de salida del GSH (1996, J. Biol. Chem. 271: 9754-9758). Adicionalmente, Kannan construyó un sistema transportador de GSH canalicular hepático de rata (RcGSHT) usando los cerebros de ratones y cobayas para analizar los fragmentos de ADNc 5, 7 y 11. Los resultados indican que el fragmento 7 representa el transportador de GSH dependiente de sodio y los fragmentos 5 y 11 representan el transportador de GSH independiente de sodio. En 1999, Ram Kannan construyó un modelo de línea celular endotelial de cerebro de ratón (MBEC-4) que simulaba la situación de la BHE (1999, J. Neurochem. 73: 390-399). El modelo demostró que el transportador de GSH dependiente de sodio se localiza en el lado luminal de la célula MBEC-4. En 2000, Ram Kannan aseveró que el GSH pasa a través de la BHE por un transportador de GSH dependiente de sodio en células endoteliales cerebrovasculares humanas (HCBC) y existe un transportador de GSH dependiente de sodio en la membrana plasmática luminal de las HCEC (2000, Brain. Res. 852: 374-382). En 2003, Zhao Zhiyang proporcionó un profármaco anticanceroso unido a glutatión s-transferasa (GST)/glutatión (GSH) por enlaces covalentes de sulfonamida para dirigirse a y tratar células cancerosas específicas después de romper los enlaces de sulfonamida citados en US2003109555. Esta modificación puede proteger los grupos amino de los fármacos, aumentar la solubilidad de los mismos, y alterar la absorción y la distribución de los mismos en el cuerpo. En 2005, Ae-June Wang et al., describieron en la patente de EE.UU. n.º 7,446,096 una invención que proporciona un sistema de administración que comprende un portador o un compuesto activo y un glutatión o un derivado del glutatión injertado sobre el mismo. La invención proporciona también un compuesto que comprende una fracción que comprende un derivado de la vitamina E o un derivado fosfolipídico, un polietilenglicol (PEG) o un derivado de polietilenglicol unido al mismo, y un glutatión (GSH) o un derivado de glutatión unido al polietilenglicol o el derivado de PEG. En 2008, Pieter Gaillard describió la administración dirigida (al SNC) de quimioterapéuticos antivíricos y otros agentes antivíricos en la solicitud de la patente de EE.UU. n.º 60/907,176 usando liposomas GSH-PEG tanto *in vitro* como *in vivo*. Más tarde ese año, Swati More y Robert Vince publicaron un artículo sobre el diseño, la síntesis y la evaluación biológica de peptidomiméticos del glutatión como componentes de profármacos antiparkinsonianos usando métodos *in vitro* (More, 2008, J. Med. Chem. 51: 4581-4588). Fabel K. et al. (Cancer, 2001, vol. 92, n.º 7, p. 1936-1942) describieron la estabilización a largo plazo en pacientes con glioma maligno después del tratamiento con doxorubicina liposómica.

[0007] Estas descripciones sin embargo no proporcionan detalles suficientes para combinaciones específicas y pertinentes entre fármacos y compuestos que tienen un uso específico para el diagnóstico y/o el tratamiento (preventivo) de trastornos específicos del SNC y relacionados. Es por lo tanto un objeto de la invención proporcionar un método seguro, eficaz y versátil para transportar una carga tal como moléculas pequeñas, péptidos, proteínas y nanocontenedores (tales como liposomas) con fármacos y genes a través de la membrana celular y a través de la barrera entre la sangre y un tejido como la barrera hematoencefálica para, entre otras cosas, dirigir fármacos al SNC usando receptores de transporte de glutatión. Sorprendentemente, establecimos que, además de las descripciones anteriormente descritas, la conjugación de glutatión y derivados del glutatión con péptidos, proteínas (como enzimas y anticuerpos), otras moléculas pequeñas y poliplejos, ya sea por acoplamiento directo o por una unión usando moléculas separadoras, es eficaz para dirigirse a agentes específicamente a receptores de transporte de glutatión.

Descripción de la invención

Definiciones

[0008] Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" como se utilizan en la presente incluyen oligómeros y polímeros lineales de monómeros o enlaces naturales o modificados, incluyendo desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, formas α -anoméricas de los mismos, ácidos nucleicos de poliamida, y similares, capaces de unirse específicamente a un polinucleótido diana por medio de un patrón regular de interacciones monómero a monómero (por ejemplo, nucleósido a nucleósido), tal como un tipo de apareamiento de bases de Watson-Crick, tipos de

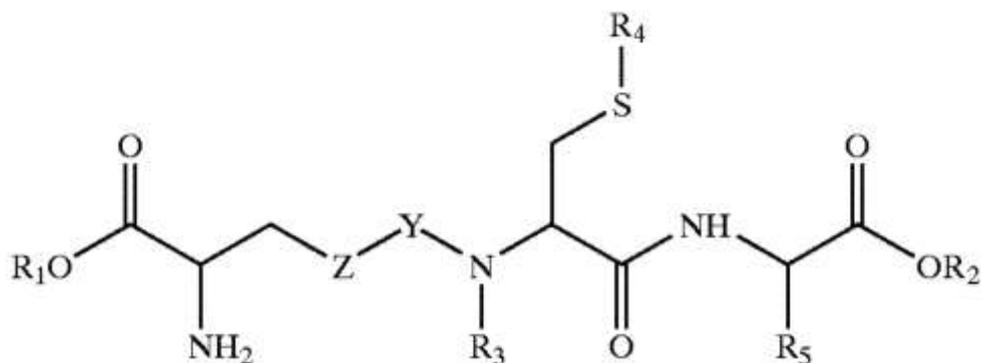
apareamiento de bases Hoogsteen o Hoogsteen inverso, o similares. Normalmente, los monómeros se unen mediante enlaces fosfodiéster o análogos de los mismos para formar oligonucleótidos que varían en tamaño desde unas pocas unidades monoméricas, por ejemplo 3-4, hasta varios cientos de unidades monoméricas. Siempre que un oligonucleótido se represente por una secuencia de letras, tal como "ATGCCTG", se entenderá que los nucleótidos están en el orden 5'→3' de izquierda a derecha y que "A" denota desoxiadenosina, "C" denota desoxicitidina, "G" denota desoxiguanosina y "T" denota timidina, a menos que se indique lo contrario. Los análogos de los enlaces fosfodiéster incluyen fosfotioato, fosfoditioato, fosfoselenato, fosfoanilotoato, fosfoanilidato, fosforamidato, N3'→P5' fosforamidato y similares. Un polinucleótido puede tener sustancialmente cualquier longitud, típicamente de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 1×10^9 nucleótidos o más. Como se utiliza en la presente, un "oligonucleótido" se define como un polinucleótido de desde 4 hasta 100 nucleótidos de longitud. Así, un oligonucleótido es un subconjunto de polinucleótidos.

[0009] Como se utiliza en la presente, el término "unión específica" significa una unión que es considerablemente diferente de una interacción no específica. Una unión específica se puede medir, por ejemplo, determinando la unión de una molécula (ligando) en comparación con la unión de una molécula (ligando) de control, que es generalmente una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión, por ejemplo, un péptido de tamaño similar que carece de una secuencia de unión específica. Una unión específica está presente si un ligando tiene una afinidad considerablemente más alta por el receptor que el ligando de control. La especificidad de unión se puede determinar, por ejemplo, por competencia con un ligando de control que se sabe que se une a una diana. El término "unión específica", como se utiliza en la presente, incluye uniones específicas tanto de baja como de alta afinidad. Una unión específica puede ser exhibida, por ejemplo, por un agente dirigido de baja afinidad que tiene una K_d de al menos aproximadamente 10^{-4} M. Por ejemplo, si un receptor tiene más de un sitio de unión para un ligando, un ligando con baja afinidad puede ser útil para dirigirse al endotelio microvascular. Unos ligandos de alta afinidad también pueden exhibir una unión específica, por ejemplo, un ligando con una K_d de al menos aproximadamente 10^{-7} M, al menos aproximadamente 10^{-8} M, al menos aproximadamente 10^{-9} M, al menos aproximadamente 10^{-10} M, o puede tener una K_d de al menos aproximadamente 10^{-11} M o 10^{-12} M o superior. Los ligandos dirigidos tanto de afinidad alta como baja son útiles para la incorporación en los conjugados de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

[0010] La presente invención se basa en un mecanismo de transporte seguro endógeno (no tóxico), llamado endocitosis mediada por receptor, para transportar fracciones terapéuticas, tales como proteínas grandes y liposomas que contienen fármacos y genes, es decir, fármacos y genes encapsulados en liposomas, a través de una membrana celular o a través de la barrera entre la sangre y un tejido como la barrera hematoencefálica para, por ejemplo, la administración cerebral de los mismos. Una gama de receptores de internalización validados y bien conocidos están presentes en las células y la barrera hematoencefálica para este uso. Estos incluyen, pero de forma no limitativa, el transportador de tiamina, el receptor de alfa(2,3)-sialoglicoproteína, el receptor de transferrina, los receptores *scavenger*, los receptores de LDL, LRP1B, LRP2, DTR, el receptor de insulina, el receptor de IGF, el receptor de leptina, el receptor de manosa-6-fosfato. La presente invención, sin embargo, se refiere a una manera más segura y eficaz de administrar específicamente, o aumentar específicamente la administración de, fármacos a las células y a través de la barrera hematoencefálica dirigiéndose a los receptores endógenos de internalización de absorción (transporte) del glutatión en los capilares del cerebro, sin modificar o interrumpir la función normal de la barrera hematoencefálica neuroprotectora.

[0011] En un primer aspecto, la presente descripción se refiere a un conjugado que comprende: a) un ligando para un transportador de glutatión; y, b) al menos uno de un agente de diagnóstico o terapéutico, y un nanocontenedor farmacéuticamente aceptable que comprende el agente; donde el ligando de a) está preferiblemente conjugado con al menos uno del agente y el nanocontenedor de b). La invención se refiere a un conjugado que comprende: a) un ligando para un transportador de glutatión; donde el ligando se selecciona del grupo que consiste en: glutatión, S-(p-bromobencil)glutatión, gamma-(L-gamma-azaglutamil)-S-(p-bromobencil)-L-cisteinilglicina, S-butilglutatión, S-decilglutatión, éster etílico de glutatión reducido, ácido glutatión sulfónico, S-hexilglutatión, S-lactoilglutatión, S-metilglutatión, S-(4-nitrobenzil)glutatión, S-octilglutatión, S-propilglutatión, n-butanoil gamma-glutamylcisteinilglicina, etanoil gamma-glutamylcisteinilglicina, hexanoil gamma-glutamylcisteinilglicina, octanoil gamma-glutamylcisteinilglicina, dodecanoil gamma-glutamylcisteinilglicina, monoisopropil éster de GSH (N-(N-L-glutamyl-L-cisteinil)glicina 1-isopropil éster sulfato monohidratado) y derivados de glutatión con la fórmula I:



donde Z=CH₂ e Y=CH₂, o Z=O e Y = C=O;

R₁ y R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en:

- 5 i) H,
 ii) alquilo lineal o ramificado (1-25C),
 iii) aralquilo (6-26C),
 iv) cicloalquilo (6-25C),
 v) heterociclos (6-20C),
 10 vi) éteres o poliéteres (3-25C), y
 vii) donde R₁-R₂ juntos tienen de 2 a 20 átomos de carbono y forman un macrociclo con el resto de la fórmula I;

R₃ se selecciona del grupo que consiste en H y CH₃;

R₄ se selecciona del grupo que consiste en alquilo 6-8C, bencilo, naftilo y un compuesto terapéuticamente activo; y,

- 15 R₅ se selecciona del grupo que consiste en H, fenilo, CH₃- y CH₂-fenilo; o,
 una sal de los mismos farmacéuticamente aceptable,
 y,

b) un liposoma que incluye una antraciclina,

donde el ligando de a) se conjuga con el liposoma de b).

- 20 [0012] Un "conjugado" se define en la presente como consistente en dos entidades que están acopladas. Preferiblemente, las dos entidades se conjugan por una interacción proteína-proteína no específica o específica, por un enlace covalente, por un enlace no covalente, por un enlace químico de coordinación, por síntesis química, ya sea directamente o mediante espaciadores, conectores o componentes de nanocontenedores no escindibles, o por tecnologías recombinantes. En el contexto de la presente descripción, la primera entidad puede ser el agente de diagnóstico y/o terapéutico o el nanocontenedor farmacéuticamente aceptable que comprende el agente mientras que, en el contexto de la presente invención, la primera entidad es un liposoma que incluye una antraciclina, mientras que la segunda entidad será un ligando para un transportador de glutatión en una célula diana. Los agentes de diagnóstico y/o terapéuticos adecuados, un nanocontenedor farmacéuticamente aceptable para tales agentes, así como ligandos adecuados para los transportadores de glutatión para usar en los conjugados de la invención se definen adicionalmente en la presente a continuación.
- 25
30

Agentes terapéuticos o de diagnóstico

[0013] Los conjugados de la invención comprenden al menos un agente que es una antraciclina. Las antraciclinas son citostáticos o agentes antineoplásicos, y son antibióticos citotóxicos/antitumorales (aclarrubicina, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, amrubicina, pirarrubicina, valrubicina, zorrubicina).

- 35 [0014] Como parte de la divulgación, el agente preferido para la incorporación en los conjugados de la invención es un agente químico de molécula pequeña. En la presente se entiende que un agente químico es una molécula química definida, normalmente una molécula no polimérica más pequeña (por ejemplo, menos de 2 kDa), es decir, al menos parcialmente orgánica, que se puede obtener normalmente por síntesis química y que no comprende un oligo o polinucleótido. Compuestos o agentes farmacológicos de interés de los que se pueden derivar fracciones farmacológicas de moléculas pequeñas se enumeran también en: Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics (9^a ed.) (Goodman et al. eds.) (McGraw-Hill) (1996); y 1999 Physician's Desk Reference (1998).
- 40

Fármacos específicos y compuestos de interés adicionales de los que se puede derivar la fracción farmacológica de la descripción incluyen, pero de forma no limitativa:

- 5 Depresores del sistema nervioso central: anestésicos generales (barbitúricos, benzodiacepinas, esteroides, derivados de ciclohexanona, y agentes misceláneos), sedantes-hipnóticos (benzodiacepinas, barbitúricos, piperidindionas y trionas, derivados de la quinazolina, carbamatos, aldehídos y derivados, amidas, ureidos acíclicos, benzacepinas y fármacos relacionados, fenotiazinas, etc.), fármacos modificadores del tono muscular voluntario central (anticonvulsivos, tales como hidantoínas, barbitúricos, oxazolidindionas, succinimidias, acilureidos, glutarimidias, benzodiacepinas, alcoholes secundarios y terciarios, derivados de la dibenzazepina, ácido valproico y derivados, análogos del GABA, etc.), analgésicos (morfina y derivados, derivados de la oripavina, derivados del morfina, fenilpiperidinas, derivados de la 2,6-metano-3-benzazocaína, difenilpropilaminas e isómeros, salicilatos, derivados del p-aminofenol, derivados de la 5-pirazolona, derivados del ácido arilacético, fenamatos e isómeros, naltrexona, metilnaltrexona, etc.) y antieméticos (anticolinérgicos, antihistamínicos, antidopaminérgicos, etc.), agentes analgésicos descritos en las patentes de EE.UU. nros.: 5,292,736, 5,688,825, 5,554,789, 5,455,230, 5,292,736, 5,298,522, 5,216,165, 5,438,064, 5,204,365, 5,017,578, 4,906,655, 4,906,655, 4,994,450, 4,749,792, 4,980,365, 4,794,110, 4,670,541, 4,737,493, 4,622,326, 4,536,512, 4,719,231, 4,533,671, 4,552,866, 4,539,312, 4,569,942, 4,681,879, 4,511,724, 4,556,672, 4,721,712, 4,474,806, 4,595,686, 4,440,779, 4,434,175, 4,608,374, 4,395,402, 4,400,534, 4,374,139, 4,361,583, 4,252,816, 4,251,530, 5,874,459, 5,688,825, 5,554,789, 5,455,230, 5,438,064, 5,298,522, 5,216,165, 5,204,365, 5,030,639, 5,017,578, 5,008,264, 4,994,450, 4,980,365, 4,906,655, 20 4,847,290, 4,844,907, 4,794,110, 4,791,129, 4,774,256, 4,749,792, 4,737,493, 4,721,712, 4,719,231, 4,681,879, 4,670,541, 4,667,039, 4,658,037, 4,634,708, 4,623,648, 4,622,326, 4,608,374, 4,595,686, 4,594,188, 4,569,942, 4,556,672, 4,552,866, 4,539,312, 4,536,512, 4,533,671, 4,511,724, 4,440,779, 4,434,175, 4,400,534, 4,395,402, 4,391,827, 4,374,139, 4,374,139, 4,361,583, 4,322,420, 4,306,097, 4,252,816, 4,251,530, 4,244,955, 4,232,018, 4,209,520, 4,164,514, 4,147,872, 4,133,819, 4,124,713, 4,117,012, 25 4,064,272, 4,022,836, 3,966,944;
- Estimulantes del sistema nervioso central: analépticos (estimulantes respiratorios, estimulantes convulsivos, estimulantes psicomotores), antagonistas narcóticos (derivados de la morfina, derivados de la oripavina, derivados de la 2,6-metano-3-benzoxacina, derivados del morfina), nootrópicos, flumazenil;
- 30 Psicofarmacológicos: sedantes ansiolíticos (benzodiacepinas, carbamatos de propanodiol) antipsicóticos (derivados de la fenotiazina, derivados de la tioxantina, otros compuestos tricíclicos, derivados e isómeros de la butirofenona, derivados de la difenilbutilamina, benzamidas sustituidas, derivados de la arilpiperazina, derivados del indol, etc.), antidepresivos (compuestos tricíclicos, inhibidores de la MAO, etc.), agentes descritos en las patentes de EE.UU. nros.: 5,192,799, 5,036,070, 4,778,800, 4,753,951, 4,590,180, 4,690,930, 4,645,773, 4,427,694, 4,424,202, 4,440,781, 5,686,482, 5,478,828, 5,461,062, 5,387,593, 5,387,586, 35 5,256,664, 5,192,799, 5,120,733, 5,036,070, 4,977,167, 4,904,663, 4,788,188, 4,778,800, 4,753,951, 4,690,930, 4,645,773, 4,631,285, 4,617,314, 4,613,600, 4,590,180, 4,560,684, 4,548,938, 4,529,727, 4,459,306, 4,443,451, 4,440,781, 4,427,694, 4,424,202, 4,397,853, 4,358,451, 4,324,787, 4,314,081, 4,313,896, 4,294,828, 4,277,476, 4,267,328, 4,264,499, 4,231,930, 4,194,009, 4,188,388, 4,148,796, 4,128,717, 4,062,858, 4,031,226, 4,020,072, 4,018,895, 4,018,779, 4,013,672, 3,994,898, 3,968,125, 40 3,939,152, 3,928,356, 3,880,834, 3,668,210;
- Fármacos de la vía respiratoria: antitusivos centrales (alcaloides de opio y sus derivados);
- Fármacos del sistema nervioso periférico: anestésicos locales (derivados de éster, derivados de amida);
- Fármacos que actúan en sitios de unión sináptica o neuroefectora: agentes colinérgicos, agentes de bloqueo colinérgico, agentes de bloqueo neuromuscular, agentes adrenérgicos, agentes antiadrenérgicos, agentes colinérgicos descritos en las patentes de EE.UU. nros.: 5,219,872, 5,219,873, 5,073,560, 5,073,560, 45 5,346,911, 5,424,301, 5,073,560, 5,219,872, 4,900,748, 4,786,648, 4,798,841, 4,782,071, 4,710,508, 5,482,938, 5,464,842, 5,378,723, 5,346,911, 5,318,978, 5,219,873, 5,219,872, 5,084,281, 5,073,560, 5,002,955, 4,988,710, 4,900,748, 4,798,841, 4,786,648, 4,782,071, 4,745,123, 4,710,508; agentes adrenérgicos descritos en las patentes de EE.UU. nros.: 5,091,528, 5,091,528, 4,835,157, 5,708,015, 50 5,594,027, 5,580,892, 5,576,332, 5,510,376, 5,482,961, 5,334,601, 5,202,347, 5,135,926, 5,116,867, 5,091,528, 5,017,618, 4,835,157, 4,829,086, 4,579,867, 4,568,679, 4,469,690, 4,395,559, 4,381,309, 4,363,808, 4,343,800, 4,329,289, 4,314,943, 4,311,708, 4,304,721, 4,296,117, 4,285,873, 4,281,189, 4,278,608, 4,247,710, 4,145,550, 4,145,425, 4,139,535, 4,082,843, 4,011,321, 4,001,421, 3,982,010, 3,940,407, 3,852,468, 3,832,470;
- 55 Fármacos activos en el músculo liso: espasmolíticos (anticolinérgicos, espasmolíticos musculotrópicos), vasodilatadores, estimulantes del músculo liso;
- Histaminas y antihistamínicos: histamina y derivados de la misma (betazol), antihistamínicos (antagonistas H1, antagonistas H2), fármacos del metabolismo de la histamina, agentes descritos en las patentes de EE.UU. nros.: 5,874,479, 5,863,938, 5,856,364, 5,770,612, 5,702,688, 5,674,912, 5,663,208, 5,658,957, 5,652,274, 60 5,648,380, 5,646,190, 5,641,814, 5,633,285, 5,614,561, 5,602,183, 4,923,892, 4,782,058, 4,393,210, 4,180,583, 3,965,257, 3,946,022, 3,931,197;
- Fármacos cardiovasculares: cardiotónicos (extractos de plantas, butenolidas, pentadienólidos, alcaloides de las especies *Erythrophleum*, ionóforos, estimulantes adrenoceptores, etc.), fármacos antiarrítmicos, agentes antihipertensivos, agentes antilipidémicos (derivados del ácido clofíbrico, derivados del ácido nicotínico,

- hormonas y análogos, antibióticos, ácido salicílico y derivados), fármacos antivaricosos, hemostáticos, agentes descritos en las patentes de EE.UU. nros.: 4,966,967, 5,661,129, 5,552,411, 5,332,737, 5,389,675, 5,198,449, 5,079,247, 4,966,967, 4,874,760, 4,954,526, 5,051,423, 4,888,335, 4,853,391, 4,906,634, 4,775,757, 4,727,072, 4,542,160, 4,522,949, 4,524,151, 4,525,479, 4,474,804, 4,520,026, 4,520,026,
- 5 5,869,478, 5,859,239, 5,837,702, 5,807,889, 5,731,322, 5,726,171, 5,723,457, 5,705,523, 5,696,111, 5,691,332, 5,679,672, 5,661,129, 5,654,294, 5,646,276, 5,637,586, 5,631,251, 5,612,370, 5,612,323, 5,574,037, 5,563,170, 5,552,411, 5,552,397, 5,547,966, 5,482,925, 5,457,118, 5,414,017, 5,414,013, 5,401,758, 5,393,771, 5,362,902, 5,332,737, 5,310,731, 5,260,444, 5,223,516, 5,217,958, 5,208,245, 5,202,330, 5,198,449, 5,189,036, 5,185,362, 5,140,031, 5,128,349, 5,116,861, 5,079,247, 5,070,099,
- 10 5,061,813, 5,055,466, 5,051,423, 5,036,065, 5,026,712, 5,011,931, 5,006,542, 4,981,843, 4,977,144, 4,971,984, 4,966,967, 4,959,383, 4,954,526, 4,952,692, 4,939,137, 4,906,634, 4,889,866, 4,888,335, 4,883,872, 4,883,811, 4,847,379, 4,835,157, 4,824,831, 4,780,538, 4,775,757, 4,774,239, 4,771,047, 4,769,371, 4,767,756, 4,762,837, 4,753,946, 4,752,616, 4,749,715, 4,738,978, 4,735,962, 4,734,426, 4,734,425, 4,734,424, 4,730,052, 4,727,072, 4,721,796, 4,707,550, 4,704,382, 4,703,120, 4,681,970, 4,681,882, 4,670,560, 4,670,453, 4,668,787, 4,663,337, 4,663,336, 4,661,506, 4,656,267, 4,656,185, 4,654,357, 4,654,356, 4,654,355, 4,654,335, 4,652,578, 4,652,576, 4,650,874, 4,650,797, 4,649,139, 4,647,585, 4,647,573, 4,647,565, 4,647,561, 4,645,836, 4,639,461, 4,638,012, 4,638,011, 4,632,931, 4,631,283, 4,628,095, 4,626,548, 4,614,825, 4,611,007, 4,611,006, 4,611,005, 4,609,671, 4,608,386, 4,607,049, 4,607,048, 4,595,692, 4,593,042, 4,593,029, 4,591,603, 4,588,743, 4,588,742, 4,588,741, 4,582,854, 4,575,512, 4,568,762, 4,560,698, 4,556,739, 4,556,675, 4,555,571, 4,555,570, 4,555,523, 4,550,120, 4,542,160, 4,542,157, 4,542,156, 4,542,155, 4,542,151, 4,537,981, 4,537,904, 4,536,514, 4,536,513, 4,533,673, 4,526,901, 4,526,900, 4,525,479, 4,524,151, 4,522,949, 4,521,539, 4,520,026, 4,517,188, 4,482,562, 4,474,804, 4,474,803, 4,472,411, 4,466,979, 4,463,015, 4,456,617, 4,456,616, 4,456,615, 4,418,076, 4,416,896, 4,252,815, 4,220,594, 4,190,587, 4,177,280, 4,164,586, 4,151,297, 4,145,443, 4,143,054, 4,123,550, 4,083,968, 4,076,834, 4,064,259, 4,064,258, 4,064,257, 4,058,620, 4,001,421, 3,993,639, 3,991,057, 3,982,010, 3,980,652, 3,968,117, 3,959,296, 3,951,950, 3,933,834, 3,925,369, 3,923,818, 3,898,210, 3,897,442, 3,897,441, 3,886,157, 3,883,540, 3,873,715, 3,867,383, 3,873,715, 3,867,383, 3,691,216, 3,624,126;
- 30 Fármacos del tracto gastrointestinal: digestivos (estomacales, coleréticos) fármacos antiulcerosos, agentes anti-diarreicos;
- Agentes esteroidales: hidrocortisona (cortisol), acetato de cortisona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona o acetato de metilprednisolona o hemisuccinato de metilprednisolona, dexametasona, betametasona, triamcinolona, beclometasona, acetato o hemisuccinato de fludrocortisona, acetato (DOCA) o hemisuccinato de desoxicorticosterona, aldosterona, incluyendo los descritos en las patentes de EE.UU. nros.:
- 35 5,863,538, 5,855,907, 5,855,866, 5,780,592, 5,776,427, 5,651,987, 5,346,887, 5,256,408, 5,252,319, 5,209,926, 4,996,335, 4,927,807, 4,910,192, 4,710,495, 4,049,805, 4,004,005, 3,670,079, 3,608,076, 5,892,028, 5,888,995, 5,883,087, 5,880,115, 5,869,475, 5,866,558, 5,861,390, 5,861,388, 5,854,235, 5,837,698, 5,834,452, 5,830,886, 5,792,758, 5,792,757, 5,763,361, 5,744,462, 5,741,787, 5,741,786, 5,733,899, 5,731,345, 5,723,638, 5,721,226, 5,712,264, 5,712,263, 5,710,144, 5,707,984, 5,705,494, 40 5,700,793, 5,698,720, 5,698,545, 5,696,106, 5,677,293, 5,674,861, 5,661,141, 5,656,621, 5,646,136, 5,637,691, 5,616,574, 5,614,514, 5,604,215, 5,604,213, 5,599,807, 5,585,482, 5,565,588, 5,563,259, 5,563,131, 5,561,124, 5,556,845, 5,547,949, 5,536,714, 5,527,806, 5,506,354, 5,506,221, 5,494,907, 5,491,136, 5,478,956, 5,426,179, 5,422,262, 5,391,776, 5,382,661, 5,380,841, 5,380,840, 5,380,839, 5,373,095, 5,371,078, 5,352,809, 5,344,827, 5,344,826, 5,338,837, 5,336,686, 5,292,906, 5,292,878, 45 5,281,587, 5,272,140, 5,244,886, 5,236,912, 5,232,915, 5,219,879, 5,218,109, 5,215,972, 5,212,166, 5,206,415, 5,194,602, 5,166,201, 5,166,055, 5,126,488, 5,116,829, 5,108,996, 5,099,037, 5,096,892, 5,093,502, 5,086,047, 5,084,450, 5,082,835, 5,081,114, 5,053,404, 5,041,433, 5,041,432, 5,034,548, 5,032,586, 5,026,882, 4,996,335, 4,975,537, 4,970,205, 4,954,446, 4,950,428, 4,946,834, 4,937,237, 4,921,846, 4,920,099, 4,910,226, 4,900,725, 4,892,867, 4,888,336, 4,885,280, 4,882,322, 4,882,319, 50 4,882,315, 4,874,855, 4,868,167, 4,865,767, 4,861,875, 4,861,765, 4,861,763, 4,847,014, 4,774,236, 4,753,932, 4,711,856, 4,710,495, 4,701,450, 4,701,449, 4,689,410, 4,680,290, 4,670,551, 4,664,850, 4,659,516, 4,647,410, 4,634,695, 4,634,693, 4,588,530, 4,567,000, 4,560,557, 4,558,041, 4,552,871, 4,552,868, 4,541,956, 4,519,946, 4,515,787, 4,512,986, 4,502,989, 4,495,102;
- 55 Citostáticos o agentes antineoplásicos: antimetabolitos: ácido fólico (aminopterina, metotrexato, pemetrexed, raltitrexed), purina (cladribina, clofarabina, fludarabina, mercaptopurina, pentostatina, tioguanina), pirimidina (citarabina, decitabina, fluorouracilo/capecitabina, floxuridina, gemcitabina, encitabina, sapacitabina); alquilantes/de tipo alquilante: mostazas de nitrógeno (clorambucil, clormetina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, bendamustina, trofosfamida, uramustina), nitrosoureas (carmustina, fotemustina, lomustina, nimustina, prednimustina, ranimustina, semustina, estreptozocina), platino (de tipo alquilante) (carboplatino, cisplatino, nedaplatino, oxaliplatino, triplatinato tetranitrato, satraplatino), sulfonatos de alquilo (busulfano, manosulfano, treosulfano), hidrazinas (procarbazona), triacenos (dacarbazona, temozolomida), aziridinas (carbocuoona, tiotepa, triazicuoona, trietilenmelamina); venenos del huso/inhibidores mitóticos: taxanos (docetaxel, larotaxel, ortataxel, paclitaxel, tasetaxel) y alcaloides de la vinca (vinblastina, vincristina, vinflunina, vindesina, vinorelbina), ixabepilona; antibióticos citotóxicos /antitumorales: antracenedionas (mitoxantrona; pixantrona), *Streptomyces* (actinomycin, bleomicina, mitomicina, plicamicina), hidroxiurea; inhibidores de topoisomerasas: *Camptotheca* (camptotecina, topotecán, irinotecán, rubitecán, belotecán), *Podophyllum*
- 65

(etopósido, tenipósido); inhibidores de tirosina quinasas: axitinib, bosutinib, cediranib, dasatinib, erlotinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, lestaurtinib, neratinib, nilotinib, semaxanib, sorafenib, sunitinib, vandetanib; inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas: alvocidib, seliciclib; fotosintetizadores: ácido aminolevulínico/aminolevulinato de metilo, efaproxiral, derivados de la porfirina (pórfimero sódico, talaporfina, temoporfina, verteporfina); otros: altretamina, amsacrina, bexaroteno, estramustina, irofulveno, trabectedina, proteína de fusión (aflibercept), denileukin diftotox, retinoides (alitretinoína, tretinoína), anagrelida, trióxido de arsénico, asparaginasa/pegaspargasa, atrasentán, bortezomib, carmofur, celecoxib, demecolcina, elesclomol, elsamitricina, etoglúcido, lonidamina, lucontona, masoprocol, mitobronitol, mitoguazona, mitotano, oblimersen, tegafur, testolactona, tiazofurine, tipifarnib, vorinostat; y los agentes descritos en las patentes de EE.UU. nros.: 5,880,161, 5,877,206, 5,786,344, 5,760,041, 5,753,668, 5,698,529, 5,684,004, 5,665,715, 5,654,484, 5,624,924, 5,618,813, 5,610,292, 5,597,831, 5,530,026, 5,525,633, 5,525,606, 5,512,678, 5,508,277, 5,463,181, 5,409,893, 5,358,952, 5,318,965, 5,223,503, 5,214,068, 5,196,424, 5,109,024, 5,106,996, 5,101,072, 5,077,404, 5,071,848, 5,066,493, 5,019,390, 4,996,229, 4,996,206, 4,970,318, 4,968,800, 4,962,114, 4,927,828, 4,892,887, 4,889,859, 4,886,790, 4,882,334, 4,882,333, 4,871,746, 4,863,955, 4,849,563, 4,845,216, 4,833,145, 4,824,955, 4,785,085, 4,684,747, 4,618,685, 4,611,066, 4,550,187, 4,550,186, 4,544,501, 4,541,956, 4,532,327, 4,490,540, 4,399,283, 4,391,982, 4,383,994, 4,294,763, 4,283,394, 4,246,411, 4,214,089, 4,150,231, 4,147,798, 4,056,673, 4,029,661, 4,012,448;

Agentes antiinfecciosos: ectoparasitocidas (hidrocarburos clorados, piretinas, compuestos sulfurados), antihelmínticos, agentes antiprotozoarios, agentes antipalúdicos, agentes antiamebícos, fármacos antileishmania, agentes antitricomoniásicos, agentes antitripanosómicos, sulfonamidas, fármacos antimicobacterianos, quimioterapéuticos antiviricos y otros agentes antiviricos como los descritos en la solicitud de patente de EE.UU. n.º: 60/907,176;

Antibióticos: aminoglicósidos, por ejemplo, amicacina, apramicina, arbekacina, bambemicinas, butirosina, dibekacina, dihidroestreptomina, fortimicina, gentamicina, isepamicina, canamicina, micromicina, neomicina, netilmicina, paromicina, ribostamicina, sisomicina, espectinomicina, estreptomina, tobramicina, trospectomicina; anfenicoles, por ejemplo, azidanfenicol, cloranfenicol, florfenicol y teimafenicol; ansamicinas, por ejemplo, rifamida, rifampicina, rifamicina, rifapentina, rifaximina; betalactámicos, por ejemplo, carbacefem, carbapenemos, cefalosporinas, cefamicinas, monobactamos, oxafemos, penicilinas; lincosamidas, por ejemplo, clinamicina, lincomicina; macrólidos, por ejemplo, claritromicina, dirtromicina, eritromicina, etc.; polipéptidos, por ejemplo, anfomicina, bacitracina, capreomicina, etc.; tetraciclinas, por ejemplo, apiciclina, clortetraciclina, clomociclina, etc.; agentes antibacterianos sintéticos, tales como las 2,4-diaminopirimidinas, los nitrofuranos, las quinolonas y los análogos de las mismas, sulfonamidas, sulfonas;

Agentes antifúngicos: polienos, por ejemplo, anfotericina B, candicidina, dermostatina, filipina, fungicromina, hachimicina, hamicina, lucensomicina, mepartricina, natamicina, nistatina, pecilocina, perimicina; antifúngicos sintéticos, tales como las alilaminas, por ejemplo, butenafina, naftifina, terbinafina; imidazoles, por ejemplo, bifonazol, butoconazol, clordantoína, clormidazol, etc.; tiocarbamatos, por ejemplo, tolclato, triazol, por ejemplo, fluconazol, itraconazol, terconazol;

Antihelmínticos: arecolina, aspidina, aspidinol, diclorofeno, embelina, kosina, naftaleno, niclosamida, peletierina, quinacrina, alantolactona, amocarcina, amoscanato, ascaridol, befenio, bitoscanato, tetracloruro de carbono, carvacrol, ciclobendazol, dietilcarbamazina, etc;

Antipalúdicos: acedapsona, amodiaquina, arteéter, artemisinina, artesunato, atovacuona, bebeerina, berberina, chirata, cloroguanida, cloroquina, clorproguanilo, quina, cinconidina, cinconina, cicloguanilo, gentiopicrina, halofantrina, hidroxiloroquina, clorhidrato de mefloquina, 3-metilarsacetina, pamaquina, plasmocid, primaquina, pirimetamina, quinacrina, quinina, quinina, quinocida, quinina, arseniato de sodio dibásico;

Agentes antiprotozoarios: acranilo, tinidazol, ipronidazol, etilestibamina, pentamidina, acetarsona, aminitrozol, anisomicina, nifuratel, tinidazol, benznidazol, suramina y similares;

Agentes antimicrobianos: como los descritos en las patentes de EE.UU. nros.: 5,902,594, 5,874,476, 5,874,436, 5,859,027, 5,856,320, 5,854,242, 5,811,091, 5,786,350, 5,783,177, 5,773,469, 5,762,919, 5,753,715, 5,741,526, 5,709,870, 5,707,990, 5,696,117, 5,684,042, 5,683,709, 5,656,591, 5,643,971, 5,643,950, 5,610,196, 5,608,056, 5,604,262, 5,595,742, 5,576,341, 5,554,373, 5,541,233, 5,534,546, 5,534,508, 5,514,715, 5,508,417, 5,464,832, 5,428,073, 5,428,016, 5,424,396, 5,399,553, 5,391,544, 5,385,902, 5,359,066, 5,356,803, 5,354,862, 5, 346,913, 5,302,592, 5,288,693, 5,266,567, 5,254,685, 5,252,745, 5,209,930, 5,196,441, 5,190,961, 5,175,160, 5,157,051, 5,096,700, 5,093,342, 5,089,251, 5,073,570, 5,061,702, 5,037,809, 5,036,077, 5,010,109, 4,970,226, 4,916,156, 4,888,434, 4,870,093, 4,855,318, 4,784, 991, 4,746,504, 4,686,221, 4,599,228, 4,552,882, 4,492,700, 4,489,098, 4,489,085, 4,487,776, 4,479,953, 4,477,448, 4,474,807, 4,470,994, 4,370,484, 4,337,199, 4,311,709, 4,308,283, 4,304,910, 4,260,634, 4,233,311, 4,215,131, 4,166,122, 4,141,981, 4,130,664, 4,089,977, 4,089,900, 4,069,341, 4,055,655, 4,049,665, 4,044,139, 4,002,775, 3,991,201, 3,966,968, 3,954,868, 3,936,393, 3,917,476, 3,915,889, 3,867,548, 3,865,748, 3,867,548, 3,865,748, 3,783,160, 3,764,676, 3,764,677;

Agentes antiinflamatorios: como se describe en las patentes de EE.UU. nros.: 5,872,109, 5,837,735, 5,827,837, 5,821,250, 5,814,648, 5,780,026, 5,776,946, 5,760,002, 5,750,543, 5,741,798, 5,739,279, 5,733,939, 5,723,481, 5,716,967, 5,688,949, 5,686,488, 5,686,471, 5,686,434, 5,684,204, 5,684,041, 5,684,031, 5,684,002, 5,677,318, 5,674,891, 5,672,620, 5,665,752, 5,656,661, 5,635,516, 5,631,283, 5,622,948, 5,618,835, 5,607,959, 5,593,980, 5,593,960, 5,580,888, 5,552,424, 5,552,422, 5,516,764,

- 5,510,361, 5,508,026, 5,500,417, 5,498,405, 5,494,927, 5,476,876, 5,472,973, 5,470,885, 5,470,842,
 5,464,856, 5,464,849, 5,462,952, 5,459,151, 5,451,686, 5,444,043, 5,436,265, 5,432,181, 5,393,756,
 5,380,738, 5,376,670, 5,360,811, 5,354,768, 5,348,957, 5,347,029, 5,340,815, 5,338,753, 5,324,648,
 5,319,099, 5,318,971, 5,312,821, 5,302,597, 5,298,633, 5,298,522, 5,298,498, 5,290,800, 5,290,788,
 5,284,949, 5,280,045, 5,270,319, 5,266,562, 5,256,680, 5,250,700, 5,250,552, 5,248,682, 5,244,917,
 5,240,929, 5,234,939, 5,234,937, 5,232,939, 5,225,571, 5,225,418, 5,220,025, 5,212,189, 5,212,172,
 5,208,250, 5,204,365, 5,202,350, 5,196,431, 5,191,084, 5,187,175, 5,185,326, 5,183,906, 5,177,079,
 5,171,864, 5,169,963, 5,155,122, 5,143,929, 5,143,928, 5,143,927, 5,124,455, 5,124,347, 5,114,958,
 5,112,846, 5,104,656, 5,098,613, 5,095,037, 5,095,019, 5,086,064, 5,081,261, 5,081,147, 5,081,126,
 5,075,330, 5,066,668, 5,059,602, 5,043,457, 5,037,835, 5,037,811, 5,036,088, 5,013,850, 5,013,751,
 5,013,736, 5,006,542, 4,992,448, 4,992,447, 4,988,733, 4,988,728, 4,981,865, 4,962,119, 4,959,378,
 4,954,519, 4,945,099, 4,942,236, 4,931,457, 4,927,835, 4,912,248, 4,910,192, 4,904,786, 4,904,685,
 4,904,674, 4,904,671, 4,897,397, 4,895,953, 4,891,370, 4,870,210, 4,859,686, 4,857,644, 4,853,392,
 4,851,412, 4,847,303, 4,847,290, 4,845,242, 4,835,166, 4,826,990, 4,803,216, 4,801,598, 4,791,129,
 4,788,205, 4,778,818, 4,775,679, 4,772,703, 4,767,776, 4,764,525, 4,760,051, 4,748,153, 4,725,616,
 4,721,712, 4,713,393, 4,708,966, 4,695,571, 4,686,235, 4,686,224, 4,680,298, 4,678,802, 4,652,564,
 4,644,005, 4,632,923, 4,629,793, 4,614,741, 4,599,360, 4,596,828, 4,595,694, 4,595,686, 4,594,357,
 4,585,755, 4,579,866, 4,578,390, 4,569,942, 4,567,201, 4,563,476, 4,559,348, 4,558,067, 4,556,672,
 4,556,669, 4,539,326, 4,537,903, 4,536,503, 4,518,608, 4,514,415, 4,512,990, 4,501,755, 4,495,197,
 4,493,839, 4,465,687, 4,440,779, 4,440,763, 4,435,420, 4,412,995, 4,400,534, 4,355,034, 4,335,141,
 4,322,420, 4,275,064, 4,244,963, 4,235,908, 4,234,593, 4,226,887, 4,201,778, 4,181,720, 4,173,650,
 4,173,634, 4,145,444, 4,128,664, 4,125,612, 4,124,726, 4,124,707, 4,117,135, 4,027,031, 4,024,284,
 4,021,553, 4,021,550, 4,018,923, 4,012,527, 4,011,326, 3,998,970, 3,998,954, 3,993,763, 3,991,212,
 3,984,405, 3,978,227, 3,978,219, 3,978,202, 3,975,543, 3,968,224, 3,959,368, 3,949,082, 3,949,081,
 3,947,475, 3,936,450, 3,934,018, 3,930,005, 3,857,955, 3,856,962, 3,821,377, 3,821,401, 3,789,121,
 3,789,123, 3,726,978, 3,694,471, 3,691,214, 3,678,169, 3,624,216;
 Agentes inmunosupresores: como los descritos en las patentes de EE.UU. nros.: 4,450,159, 4,450,159,
 5,905,085, 5,883,119, 5,880,280, 5,877,184, 5,874,594, 5,843,452, 5,817,672, 5,817,661, 5,817,660,
 5,801,193, 5,776,974, 5,763,478, 5,739,169, 5,723,466, 5,719,176, 5,696,156, 5,695,753, 5,693,648,
 5,693,645, 5,691,346, 5,686,469, 5,686,424, 5,679,705, 5,679,640, 5,670,504, 5,665,774, 5,665,772,
 5,648,376, 5,639,455, 5,633,277, 5,624,930, 5,622,970, 5,605,903, 5,604,229, 5,574,041, 5,565,560,
 5,550,233, 5,545,734, 5,540,931, 5,532,248, 5,527,820, 5,516,797, 5,514,688, 5,512,687, 5,506,233,
 5,506,228, 5,494,895, 5,484,788, 5,470,857, 5,464,615, 5,432,183, 5,431,896, 5,385,918, 5,349,061,
 5,344,925, 5,330,993, 5,308,837, 5,290,783, 5,290,772, 5,284,877, 5,284,840, 5,273,979, 5,262,533,
 5,260,300, 5,252,732, 5,250,678, 5,247,076, 5,244,896, 5,238,689, 5,219,884, 5,208,241, 5,208,228,
 5,202,332, 5,192,773, 5,189,042, 5,169,851, 5,162,334, 5,151,413, 5,149,701, 5,147,877, 5,143,918,
 5,138,051, 5,093,338, 5,091,389, 5,068,323, 5,068,247, 5,064,835, 5,061,728, 5,055,290, 4,981,792,
 4,810,692, 4,410,696, 4,346,096, 4,342,769, 4,317,825, 4,256,766, 4,180,588, 4,000,275, 3,759,921;
 Iminoazúcares: desoxinójirimicina o un derivado de la desoxinójirimicina, como N-propildesoxinójirimicina, N-
 butildesoxinójirimicina, N-butildesoxigalactonójirimicina, N-pentildesoxinójirimicina, N-heptildesoxinójirimicina,
 N-pentanoildesoxinójirimicina, N-(5-adamantano-1-ilmetoxi)pentil)-desoxinójirimicina, N-(5-colesteroxipentil)-
 desoxinójirimicina, N-(4-adamantanometanilcarboxi-1-oxo)-desoxinójirimicina, N-(4-adamantanilcarboxi-1-
 oxo)-desoxinójirimicina, N-(4-fenantrilcarboxi-1-oxo)-desoxinójirimicina, N-(4-colesterilcarboxi-1-oxo)-
 desoxinójirimicina o N-(4-β-colestanilcarboxi-1-oxo)-desoxinójirimicina;
 Análogos de ceramidas: D-treo-1-fenil-2-palmitoilamino-3-pirrolidino-1-propanol (P4) o un derivado de P4,
 como D-treo-4'-hidroxi-1-fenil-2-palmitoilamino-3-pirrolidino -1-propanol (4'-hydroxy-P4), D-treo-1-(3,4-
 trimetilenedioxi)fenil-2-palmitoilami no-3-pirrolidino-1-propanol (trimetilenedioxi-P4), D-treo-1-(3',4'-
 metilenedioxi)fenil-2-palmitoilamino- 3-pirrolidino-1-propanol (metilenedioxi-P4) y D-treo-1-(3,4-etilendioxi)fenil-
 2-palmitoilamino-3 -pirrolidino-1-propanol (etilendioxi-P4 o D-t-et-P4);
 En una forma de realización alternativa de los conjugados de la divulgación, el agente es un agente que
 comprende un péptido o un polipéptido (proteína), tales como factores de crecimiento, citocinas, enzimas,
 anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y similares. Fármacos (poli)peptídicos específicos y compuestos de
 interés de los que se puede derivar la fracción farmacológica incluyen, pero de forma no limitativa:
- Fármacos de la sangre y el sistema hemopoyético: fármacos antianemia, fármacos de coagulación
 sanguínea (hemostáticos, anticoagulantes, antitrombóticos, trombolíticos, proteínas sanguíneas y sus
 fracciones), hemoglobina;
 Citocinas: Intron® o interferón alfa; Proleukin® IL-2 o aldesleucina, interferón alfa, interferón beta
 (Avonex® o interferón beta-1a; Betaseron®/Betaferon® o interferón beta-1b; Rebif® o interferón beta-1a),
 interferón gamma, interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 3 (IL-3), interleucina 4 (IL-4),
 interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), TNF, factor estimulante de colonias de granulocitos y
 macrófagos (GM-CSF: Leukine® o sargramostim), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-
 CSF: Neupogen® o filgrastim), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de
 crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF);

Enzimas: Cerezyme® o glucocerebrosidasa; Aldurazyme™ o laronidasa; Arylase™ o arilsulfatasa B; I2S o iduronato-2-sulfatasa; alfa-L-iduronidasa; N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa; fenilasa; aspartilglucosaminidasa; lipasa ácida; transportador de cisteína; Lamp-2; alfa-galactosidasa A; ceramidasa; alfa-L-fucosidasa; ss-hexosaminidasa A; deficiencia de activador de GM2; alfa-D-manosidasa; ss-D-manosidasa; arilsulfatasa A; saposina B; neuraminidasa; alfa-N-acetilglucosaminidasa fosfotransferasa; subunidad 7 de fosfotransferasa; heparán-N-sulfatasa; a-N-acetilglucosaminidasa; acetil CoA: N-acetiltransferasa; N-acetilglucosamina 6-sulfatasa; galactosa 6-sulfatasa; O-galactosidasa; hialuronoglucosaminidasa; sulfatasas múltiples; palmitoil proteína tioesterasa; tripeptidil peptidasa I; esfingomielinasa ácida; tráfico de colesterol; catepsina K; alfa-galactosidasa B; transportador de ácido siálico; SOD o superóxido dismutasa de Cu/Zn; neprilisina; agentes detoxificadores o depuradores (organofosfatos): rodanasa, paraoxonasa; fosfotriesterasa; butirilcolinesterasa; anhidrasa ácida de organofosforados; o un depurador no polipeptídico como el ácido pentético o ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA); oximas;

Hormonas que actúan en el cerebro y neurotransmisores: somatostatina, oxitocina, vasopresina, guaranina, VIP, corticotropina (ACTH), colecistoquinina (CCK), sustancia P, bombesina, motilina, glicentina, glucagón, péptido similar al glucagón (GLP-1), leptina;

Neuropéptidos y derivados de los mismos: péptido YY (PYY), neuropéptido Y (NPY), polipéptido pancreático (PP), neuroquinina A, neuroquinina B, endorfina, encefalina, met-enkefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met), dalargina, loperamida, endomorfinas 1 y 2, neurotensina, neuromedina K, neuromedina L, péptido relacionado con la calcitonina (CGRP), endotelina, ANP ("péptido natriurético auricular"), BNP ("péptido natriurético cerebral"), CNP ("péptido natriurético de tipo C") y PACAP ("péptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria"), TAPP (H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe-NH₂), senktide (secuencia DFFGLM con modificaciones: Asp-1 = succinil-Asp, Phe-3 = Me-Phe, Met-6 = amida C-terminal);

Factores neurotróficos: factor de crecimiento nervioso o NGF; BDNF o factor neurotrófico derivado del cerebro; NT3 o neurotrofina-3; NT4 o neurotrofina-4; NT5 o neurotrofina-5; RDGF o factor de crecimiento derivado de la retina; CNTF o factor neurotrófico ciliar; activina; bFGF o factor de crecimiento fibroblástico básico; aFGF o factor de crecimiento fibroblástico ácido; GDNF o factor neurotrófico derivado de líneas celulares gliales o neublastina o artemina o enovina, persefina, neurturina; CTGF o factor de crecimiento de tejido conjuntivo; EGF o factor de crecimiento epitelial; eritropoyetinas (EPO) (Procrit®/Eprex® o eritropoyetina alfa; Epogen® o eritropoyetina; NeoRecormon® o eritropoyetina beta; Aranesp® o darbepoyetina alfa); hormona del crecimiento o somatotropina (Humatrope®; Protropin®/Nutropin®; Serostim®; Saizen®); Mab anti-NogoA (IN-1); antagonista de Nogo-A, B o C, o inhibidor de Nogo66 (NEP1-40); Lingo-1; péptido FGL (pGlu-Val-Tyr-Val-Val-Ala-Glu-Asn-Gln-Gln-Gly-Lys-Ser-Lys-Ala o EVYVVAENQQGKSKA); NAP (Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln, código de aminoácidos de una letra, NAPVSIQ); ADFN-9 (Ser-Ala-Leu-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-Ala, SALLRSIPA);

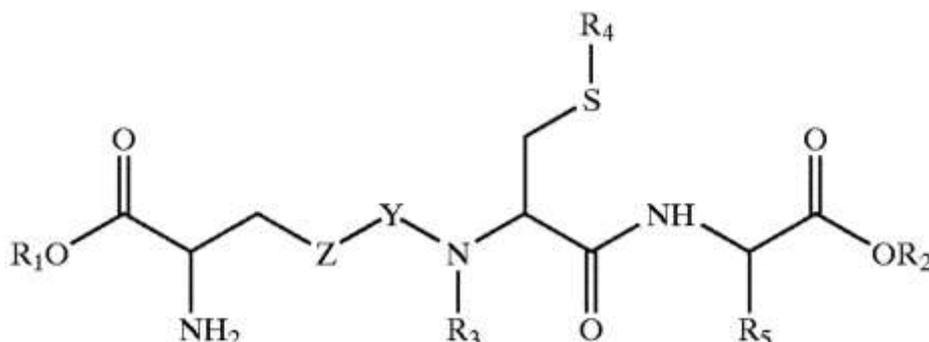
Anticuerpos: 3F8, abagovomab, abatacept (Orencia), abxiximab (Reopro), acz885 (canakinumab), adalimumab (Humira), adecatumumab, aflibercept, afutuzumab, alacizumab pegol, alemtuzumab (Campath), altumomab, afelimomab, anatumomab mafenatox, anrukinzumab (IMA-638), apolizumab, arcitumomab, aselizumab, atlizumab, atorolimumab, bapineuzumab, basiliximab (Simulect), bavituzumab, bectumomab (LymphoScan), belatacept, belimumab (LymphoStat-B), bertilimumab, besilesomab, bevacizumab (Avastin), biciromab bralobarbital, bivatumumab mertansina, blinatumomab, canakinumab, cantuzumab mertansina, capromab pendetida (Prostascint), catumaxomab (Removab), cedelizumab, certolizumab pegol (Cimzia), cetuximab (Erbix), citatumumab bogatox, cixutumumab, claretuzumab tetraxetán, clenoliximab, clivatuzumab tetraxetán, CNTO 148 (golimumab), CNTO 1275 (ustekinumab), conatumumab, dacetuzumab, dacliximab o daclizumab (Zenapax), denosumab, detumomab, dorlimomab aritox, dorlixizumab, drimakinumab, ecomeximab, eculizumab (Soliris), edobacomab, edrecolomab (Panorex), efalizumab (Raptiva), efungumab (Mycograb), elsilimumab, enlimomab pegol, epitumomab cituxetán, epratuzumab, erlizumab, ertumaxomab (Rexomon), etanercept (Enbrel), etaracizumab, exbivirumab, fanolesomab (NeuroSpec), faralimumab, felvizumab, figitumumab, fontolizumab (HuZAF), foravirumab, galiximab, gantenerumab, gavilimumab, gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg), ginakinzumab, golimumab, gomiliximab, ibalizumab, ibritumomab tiuxetán (Zevalin), igovomab, imciromab, infliximab (Remicade), inolimumab, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab, iratumumab, ixutumumab, keliximab, labetuzumab, lemalesomab, lebrilizumab, lerdelimomab, lexatumumab, libivirumab, lintuzumab, lucatumumab, lumiliximab, mapatumumab, maslimomab, matuzumab, mepolizumab (Bosatria), metelimomab, milatumumab, minretumomab, mitumomab, morolimumab, motavizumab (Numax), Muromonab, MYO-029 (stamulumab), nacolomab tafenatox, naptumomab estafenatox, natalizumab (Tysabri), nebacumab, nerelimomab, nimotuzumab (BIOMAbEGFR), nofetumomab merpentán (Verluma), ocrelizumab, odulimumab, ofatumumab, omalizumab (Xolair), oregovomab (OvaRex), otelixizumab, pagibaximab, palivizumab (Synagis), pantuzumab tetraxetán, panitumumab (Vectibix), pascolizumab, pemtumomab (Theragyn), pertuzumab (Omnitarg), pexelizumab, pintumomab, priliximab, primumab, PRO 140, rafivirumab, ramucirumab, ranibizumab (Lucentis), raxibacumab, regavirumab, reslizumab, riloncept (Arcalyst), rintalizumab, rituximab (MabThera, Rituxan), robatumumab, rovelizumab, ruplizumab, satumomab, sevirumab, sibrotuzumab, sipilizumab, sonpevizumab, sontuzumab, stamulumab, stolanuzumab, sulesomab (LeukoScan), tacatumumab tetraxetán, tadocizumab, talizumab, tanezumab, taplitumomab paptox, tefibazumab (Aurexis), telimumab aritox, tenatumomab, teneliximab, teplizumab, TGN1412, ticilimumab

5 (tremelimumab), tigatuzumab, TNX-355 (ibalizumab), TNX-650, TNX-901 (talizumab), tocilizumab (Actemra), toralizumab, tositumomab (Bexxar), trastuzumab (Herceptin), tremelimumab, tucotuzumab celmoleucina, tivirumab, urtoxazumab, ustekinumab, vopaliximab, vedolizumab, veltuzumab, vepalimomab, vimakinzumab, visilizumab (Nuvion), volociximab, vontakinzumab, votumumab (HumaSPECT), zalutumumab, zanolimumab (HuMax-CD4), ziralimumab, zolimomab aritox, o los fragmentos funcionales (de unión con los epítomos) de los mismos;

10 En una forma de realización alternativa de los conjugados de la divulgación, el agente es un agente que incluye un oligo o polinucleótido. Un agente que incluye un oligo o polinucleótido puede ser cualquiera de una vacuna de ADN, un oligonucleótido antisentido, una ribozima, un ADN catalítico (ADNzima) o una molécula de ARN, un ARNip o un constructo de expresión que codifica los mismos. Una vacuna de ADN se entiende en la presente que significa un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un antígeno específico, que es capaz de expresar el antígeno tras la introducción del constructo en una célula de un organismo huésped que va a vacunarse con la vacuna de ADN.

Ligandos

15 [0015] La segunda entidad en los conjugados de la invención es un ligando para un transportador de glutatión. El ligando se selecciona del grupo que consiste en: glutatión, S-(p-bromobencil)glutatión, gamma-(L-gamma-azaglutamil)-S-(p-bromobencil)-L-cisteinilglicina, S-butilglutatión, S-decilglutatión, éster etílico de glutatión reducido, ácido glutatión sulfónico, S-hexilglutatión, S-lactoilglutatión, S-metilglutatión, S-(4-nitrobenzil)glutatión, S-octilglutatión, S-propilglutatión, n-butanoil gamma-glutamylcisteinilglicina, etanoil gamma-glutamylcisteinilglicina, hexanoil gamma-glutamylcisteinilglicina, octanoil gamma-glutamylcisteinilglicina, dodecanoil gamma-glutamylcisteinilglicina, éster monoisopropílico de GSH (N-(N-L-glutamyl-L-cisteinil)glicina 1-isopropil éster sulfato monohidratado) y derivados de glutatión con la fórmula I:



25 donde Z=CH₂ e Y=CH₂, o Z=O e Y = C=O;
R₁ Y R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en:

- 30 i) H,
ii) alquilo lineal o ramificado (1-25C),
iii) aralquilo (6-26C),
iv) cicloalquilo (6-25C),
v) heterociclos (6-20C),
vi) éteres o poliéteres (3-25C), y
vii) donde R₁-R₂ juntos tienen de 2 a 20 átomos de carbono y forman un macrociclo con el resto de la fórmula I;

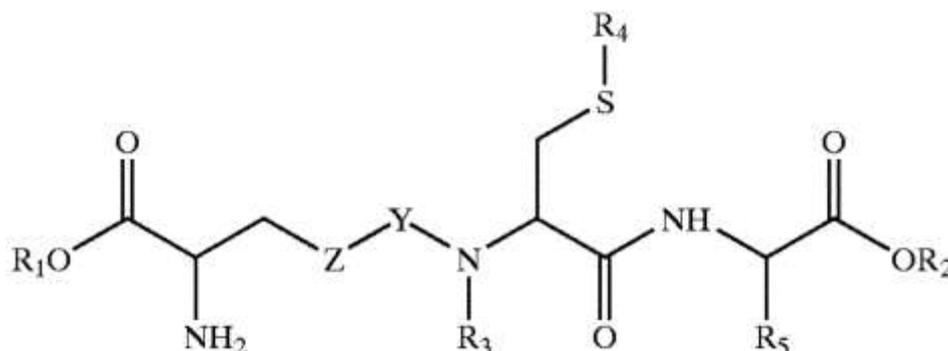
35 R₃ se selecciona del grupo que consiste en H y CH₃;
R₄ se selecciona del grupo que consiste en alquilo 6-8C, bencilo, naftilo y un compuesto terapéuticamente activo;
y,
R₅ se selecciona del grupo que consiste en H, fenilo, CH₃- y CH₂-fenilo; o una sal de los mismos farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente el transportador de glutatión media al menos una de entre la unión específica, la endocitosis y la transcitosis del ligando y el conjugado que comprende el ligando en y/o a través de una célula diana que expresa el transportador. La administración mediada por transportadores o receptores es una técnica de administración dirigida de fármacos posible que se ha desarrollado en los últimos años. Tiene la ventaja potencial de una alta especificidad de administración a las células diana que expresan un receptor/transportador para el ligando que está conjugado con un fármaco o un portador farmacológico. La dirección específica de agentes terapéuticos o de diagnóstico de bajo peso molecular, así como a base de polipéptidos y ácidos nucleicos, y de

nanocontenedores que comprenden estos agentes, a células y tejidos se puede aumentar inmensamente a través del uso de una administración mediada por transportadores/receptores.

[0016] En una forma de realización, el ligando en los conjugados de la invención es un ligando para un transportador de glutatión que se expresa en células endoteliales de una barrera entre la sangre y un tejido, incluyendo, por ejemplo, la barrera entre la sangre y los testículos y las barreras entre la sangre y el SNC, tales como, por ejemplo, la barrera hematoencefálica, la barrera entre la sangre y el líquido cefalorraquídeo (LCR), la barrera entre los vasos piales y el LCR, el epéndimo y la glía limitante, la barrera entre la sangre y la retina, la barrera entre la sangre y los nervios, y la barrera entre la sangre y la médula espinal. Un ligando preferido es un ligando para un transportador de glutatión que se expresa en células endoteliales de la barrera hematoencefálica y/o células parenquimales cerebrales (neuronas y neuroglía). El uso de tales ligandos permitirá la administración específica, o la administración específicamente aumentada, de tales agentes dirigidos al sistema nervioso central (SNC) para el tratamiento de enfermedades del cerebro. La dirección mediada por receptores puede además combinarse con sistemas de administración de fármacos no específica (como conjugados de proteínas, pegilación, nanopartículas, liposomas y similares) para mejorar inmensamente las propiedades farmacocinéticas y de biodistribución de los fármacos, que redirigirán significativamente los fármacos específicamente a células, tejidos y órganos que expresan los receptores, incluyendo aquellos protegidos por barreras específicas entre la sangre y un tejido como, por ejemplo, el SNC, la barrera hematoencefálica (BHE), la retina y los testículos.

[0017] En una forma de realización preferida, por lo tanto, el ligando que se va a incorporar en los conjugados de la invención, es un ligando para un transportador de glutatión endógeno en una célula diana. El ligando es preferiblemente un ligando para un transportador de glutatión de una célula diana de vertebrados, más preferiblemente un transportador de glutatión de una célula diana de mamíferos y más preferiblemente un transportador de glutatión de una célula diana humana. El ligando es preferiblemente un ligando que se une específicamente al transportador de glutatión. Más preferiblemente, el ligando se une específicamente al transportador de GSH dependiente de sodio como el presente en las células endoteliales cerebrovasculares humanas como se describe por Kannan et al. (2000, Brain Res. 852(2):374-82). La unión específica de un ligando a un transportador es preferiblemente tal y como se ha definido en la presente anteriormente. En otra forma de realización, el ligando es un ligando que realiza una endocitosis y/o transcitosis en y/o a través de la célula diana como se puede evaluar con un modelo de cultivo celular de la BHE (usando células endoteliales capilares de cerebro bovino aisladas primarias (BCEC)) como se describe por Gaillard et al. (2001, Eur J Pharm Sci. 12(3): 215-222), o modelos similares usando, por ejemplo, células RBE4 o células MDCK como células diana. Un ligando que realiza una endocitosis y/o transcitosis en y/o a través de la célula diana se define en la presente como un ligando que realiza una endocitosis o transcitosis en o a través de una célula diana BCEC o MDCK a una velocidad que está aumentada al menos un 5, un 10, un 20 o un 50% en comparación con enfermedades control seleccionadas de a) células carentes de expresión de transportadores de GSH; b) células pretratadas con exceso de GSH libre; y c) un compuesto de referencia que carece de una fracción de GSH; cuando se mide a los 15, 30 o 60 minutos o 1, 2, 4, 8 o 18 horas o menos después de la adición del ligando a la célula diana. Alternativamente, la endocitosis y/o la transcitosis de ligandos dirigidos a transportadores de GSH se pueden evaluar por técnicas de bioimagen *in vivo* que usan, por ejemplo, tintes de infrarrojo cercano o marcadores radiactivos conjugados a los mismos, dando como resultado al menos un 10, un 20 o un 50% de retención aumentada en el área del SNC del ligando en puntos de tiempo dados (en función de la cuantificación de píxeles de la región de interés (ROI)), en comparación con enfermedades de control apropiadas (por ejemplo, en comparación con compuestos de referencia carentes de fracciones de GSH).

[0018] Los ligandos preferidos que se unen al transportador de glutatión, para el uso conforme a la presente invención, incluyen, por ejemplo, ligandos seleccionados del grupo que consiste en: glutatión (GSH o gamma-glutamylcisteinilglicina), S-(p-bromobencil)glutatión, gamma-(L-gamma-azaglutamil)-S-(p-bromobencil)-L-cisteinilglicina, S-butylglutatión, S-decylglutatión, éster etílico de glutatión reducido, ácido glutatión sulfónico, S-hexilglutatión, S-lactoilglutatión, S-metilglutatión, S-(4-nitrobenzil)glutatión, S-octilglutatión, S-propilglutatión, n-butanoil gamma-glutamylcisteinilglicina (conocido también por la abreviatura GSH-C4) o los derivados etanoil, hexanoil, octanoil o dodecanoil de los mismos (conocidos también por las abreviaturas GSH-C2, GSH-C6, GSH-C8 y GSH-C12, respectivamente), monoisopropil éster de GSH (también conocido como N-(N-L-glutamyl-L-cisteinil)glicina 1-isopropil éster sulfato monohidratado o YM737), y derivados de GSH como se describe en la patente de EE.UU. n.º 6,747,009 con la fórmula I:



donde Z=CH₂ e Y=CH₂, o Z=O e Y=C,

R₁ Y R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo lineal o ramificado (1-25C), aralquilo (6-26C), cicloalquilo (6-25C), heterociclos (6-20C), éteres o poliéteres (3-25C), y donde R₁-R₂ juntos tienen de 2 a 20 átomos de carbono y forman un macrociclo con el resto de la fórmula I;

R₃ se selecciona del grupo que consiste en H y CH₃,

R₄ se selecciona del grupo que consiste en alquilo 6-8C, bencilo, naftilo y un compuesto terapéuticamente activo, y

R₅ se selecciona del grupo que consiste en H, fenilo, CH₃ y CH₂-fenilo o una sal de los mismos farmacéuticamente aceptable.

[0019] En una forma de realización preferida, R₃ en la fórmula anterior es H. En otra forma de realización preferida, R₄ en la fórmula anterior es bencilo. En otra forma de realización preferida adicional, R₅ en la fórmula anterior es fenilo.

[0020] En una forma de realización preferida de la invención, el ligando se conjuga o se sintetiza a través del residuo del aminoácido N-terminal, es decir, el grupo amino del residuo de ácido glutámico.

[0021] En otra forma de realización preferida de la invención, el ligando se conjuga o se sintetiza a través del residuo del aminoácido C-terminal, es decir, el grupo carboxilo del residuo de glicina.

[0022] En otra forma de realización preferida de la invención, el ligando se conjuga o se sintetiza a través del grupo tiol (SH) de la fracción de cisteína.

20 Nanocontenedores

[0023] Los ligandos en los conjugados de la divulgación se pueden conjugar directamente a los agentes, o alternativamente, los ligandos se pueden conjugar a nanocontenedores farmacéuticamente aceptables que comprenden los agentes. En tales conjugados, los agentes pueden, por ejemplo, encapsularse dentro de nanocontenedores, tales como nanopartículas, liposomas o nanogeles, por lo cual el ligando se conjuga preferiblemente acoplado a un nanocontenedor de ese tipo. Los ligandos en los conjugados de la invención se conjugan a nanocontenedores farmacéuticamente aceptables que comprenden los agentes. En tales conjugados, el agente se encapsula dentro de nanocontenedores, que son liposomas, por lo cual el ligando se conjuga con un nanocontenedor de ese tipo. Tal conjugación con el nanocontenedor puede ser o directamente o a través de cualquiera de los agentes de conjugación poliméricos bien conocidos tales como la esfingomielina, el polietilenglicol (PEG) u otros polímeros orgánicos. Los detalles de la producción de tales composiciones farmacéuticas que comprenden liposomas (PEG) dirigidos se describen en la patente de EE.UU. n.º 6,372,250. Así, en una forma de realización preferida, un conjugado según la divulgación es un conjugado donde el portador farmacéuticamente aceptable comprende al menos uno de entre: una proteína portadora, un nanocontenedor, un liposoma, un sistema de polipéptidos, un sistema de lipopéptidos, y polietilenglicol.

[0024] En conjugados de la divulgación donde el agente comprende un poli u oligonucleótido, el portador farmacéuticamente aceptable es preferiblemente un sistema de lipopéptidos que comprende al menos uno de entre lípidos catiónicos o lípidos anfóteros (como se detalla en WO2002/066012), o un sistema de polipéptidos que comprende al menos una de entre poli-L-lisina, poli-L-ornitina, polietilenoimina y poliamidoamina. Hay dos tipos principales de sistemas de administración no vírica para la administración intracelular de fármacos antivíricos a base de ácidos nucleicos (como vacunas de ADN, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, ADN catalítico (DNAzimas) o moléculas de ARN, ARNsi o plásmidos codificantes de los mismos), que comprenden sistemas de lipopéptidos (liposomas catiónicos que contienen ADN) y sistemas de polipéptidos (ADN unido a un polímero catiónico). En una forma de realización preferida de la divulgación, el portador farmacéutico aceptable es un sistema de

lipoplejos o un sistema de poliplejos. Además, el portador farmacéutico aceptable puede además preferiblemente comprender un conjugado proteico, polietilenglicol (pegilación), una nanopartícula o un liposoma. Los sistemas de poliplejos comprenden polímeros catiónicos tales como poli-L-lisina (PLL), poli-L-ornitina (POL), polietilenimina (PEI), poliamidoamina (PAM) o combinaciones de los mismos con ADN. Los sistemas policatiónicos entran en las células principalmente por endocitosis de adsorción o de fase fluida. Los polímeros catiónicos, incluyendo la PEI, tienen la capacidad para condensar ADN y para desestabilizar el potencial de membrana. Además, se ha demostrado que la administración de plásmidos por sistemas de poliplejos de PEI podrían conseguirse controlando las propiedades físicas químicas y biológicas del complejo. Sin embargo, la eficiencia de transfección y expresión génica son limitadas en comparación con los sistemas de transducción víricos. Debido a que los sistemas de PEI pueden perturbar las membranas, pueden causar también toxicidad, que se correlaciona con el peso molecular y la concentración nuclear del polímero. A este respecto se demostró que la PEI lineal (22 kDa) era más tóxica que la PEI ramificada (25 kDa) y también se relacionó con la cantidad de PEI usada en los sistemas de poliplejos expresada por la proporción N/P (cantidad de nitrógeno en el polímero relacionada con la cantidad de ADN). Otros afirman que los sistemas de poliplejos de PEI lineal mostraron una mejor viabilidad celular y una eficiencia de transfección más alta. Recientemente se han sintetizado varios derivados de PEI biodegradables con mejores propiedades de transfección y menos toxicidad que la PEI lineal. En general, la eficacia de los sistemas de PEI y probablemente policatiónicos en general depende del peso molecular, la carga catiónica total y el grado de ramificación. Cuando se unen a ADN, otros factores como la cantidad de ADN, el tamaño de partícula y el potencial zeta son características importantes. Además, los sistemas policatiónicos cargados positivamente interactúan fácilmente con las proteínas plasmáticas cargadas negativamente cuando se administran por vía intravenosa y se produce la opsonización después de la unión a las proteínas sanguíneas que se dirigen contra ellos para que sean retirados por el sistema reticuloendotelial (SRE). Particularmente, la formación de agregados lleva a la absorción por células fagocíticas y el atrapamiento por redes capilares (principalmente de los pulmones después de la administración intravenosa) que resulta en un aclaramiento rápido del compartimento de plasma y una transfección pobre de los tejidos/órganos diana. Sin embargo, la pegilación puede reducir esto drásticamente. Además, la aplicación de un ligando dirigido/de internalización evita la necesidad de aplicar sistemas de poliplejos con una proporción N/P grande y por lo tanto una carga positiva total alta y puede por lo tanto reducir muchos problemas que se asocian con polímeros catiónicos (tales como la toxicidad, la unión a constituyentes sanguíneos). Los sistemas de lipoplejos desnudos son también opsonizados fácilmente por componentes del suero y aclarados por mecanismos similares a los sistemas de poliplejos, por ejemplo, por el sistema reticuloendotelial (SRE). Además, aunque las CpG no metiladas de los sistemas de lipoplejos se enmascaran para prevenir una respuesta inmune innata, una vez que están en la circulación general, los sistemas de lipoplejos pueden opsonizarse, de forma similar a los sistemas de poliplejos, por proteínas sanguíneas (C3, IgG, lipoproteínas y fibronectina), lo que resulta en reacciones inflamatorias (mediadas por TNF alfa, IL-6 e IL-12) en los pulmones y el hígado. Además, se ha descubierto la activación del complejo y la activación de las células T-, B- y NK y los macrófagos y se relacionaron con la dosis inyectada de lipoplejo. Junto a la reducción del número de CpG no metiladas, tales interacciones se pueden limitar por pegilación de estos sistemas o usando agentes inmunosupresores (por ejemplo, dexametasona). Además, la cinética de estos sistemas se mejoró considerablemente por pegilación, lo que redujo su aclaramiento sistémico y aumentó la eficiencia de dirección (mediante la aplicación de ligandos dirigidos selectivos/específicos). Además, la disminución del tamaño de los sistemas de lipoplejos parece ser un factor clave en su distribución tisular y su absorción celular y aumenta su eficiencia de transfección. Generalmente, la distribución tisular y la persistencia de la expresión de sistemas de lipoplejos y poliplejos depende principalmente, como con los fármacos moleculares pequeños después de la administración parenteral, también de la farmacocinética (aclaramiento, volumen de distribución), la formulación (tamaño, carga, pegilación, etc.) y el régimen de dosificación (bolo de gran volumen, inyección secuencial, infusión constante). Respecto al régimen de dosificación resulta interesante observar que la inyección secuencial de lipoplejos y ADN plasmídico resultó en una expresión más alta pero también una inducción de citocinas minimizada. Además, la administración en el tejido/órgano diana es dependiente del flujo sanguíneo y la absorción en el tejido/órgano o la permeabilidad y el equilibrio de aclaramiento de los tejidos/órganos diana y no diana. Por lo tanto, debería diseñarse un régimen de dosificación apropiado, en base a parámetros farmacocinéticos, para optimizar la administración/dirección a los órganos y tejidos. Además, esto debería armonizarse con respecto a la farmacocinética intracelular. La farmacocinética intracelular (distribución, eliminación) de los sistemas de lipoplejos y poliplejos después de la absorción celular es una cuestión importante. Además de la absorción mediada por receptores, la internalización (mediante la vía dependiente de la clatrina o las caveolas) particularmente de los sistemas de PEI no dirigidos parecen depender tanto de la línea celular como del tipo de poliplejo de PEI (PEI lineal vs PEI ramificada). Con frecuencia, tales sistemas acaban en endosomas tardíos, por lo tanto, necesitan escapar de estos orgánulos para entrar en el citoplasma para, en última instancia, alcanzar el núcleo. Los sistemas catiónicos como los sistemas de poliplejos pueden escapar de los endosomas/lisosomas porque tienen la capacidad para amortiguar el pH y causar una inflamación osmótica de estos orgánulos según la teoría denominada "escape mediado por esponja de protones". Sin embargo, parece que una fracción pequeña de los sistemas internalizados escapa al citoplasma y que una gran parte se queda en los endosomas/lisosomas y se degrada. Sin embargo, se ha demostrado que la incorporación de lípidos fusogénicos o péptidos catiónicos (melitina) en estos sistemas podría aumentar su escape endosomal. Una vez en el citosol, los plásmidos lineales se pueden degradar fácilmente por nucleasas, mientras que los plásmidos circulares son mucho más estables. Por lo tanto, se prefieren moléculas de ácido desoxinucleico circulares. Particularmente, las nucleasas sensibles al calcio parecen ser responsables de esta degradación. En última instancia, los plásmidos tienen que ser transportados al núcleo a través del complejo del poro nuclear (CPN), que forma un canal acuoso a través de la

membrana nuclear, y se estimó que aproximadamente el 0,1% de los plásmidos son capaces de entrar en el núcleo desde el citosol. Las moléculas menores de 40 kDa pueden pasar pasivamente por el CPN mientras que las moléculas mayores (> 60 kDa) necesitan una señal de localización nuclear (SLN) específica para ser activamente transportada a través del CPN permitiendo el transporte de moléculas de hasta 25-50 MDa. De hecho, se demostró que el acoplamiento de una SLN con plásmidos aumentó la acumulación nuclear y la expresión de ADN plasmídico. Preferiblemente, por lo tanto, se acopla una SLN con cualquier constructo de expresión para usar en los conjugados de la divulgación.

[0025] Una gran variedad de métodos para la conjugación de ligandos con los agentes o portadores se conocen en la técnica. Tales métodos son, por ejemplo, descritos por Hermanson (1996, Bioconjugate Techniques, Academic Press), en U.S. 6,180,084 y U.S. 6,264,914. e incluyen, por ejemplo, métodos usados para unir haptenos con proteínas portadoras como se usa de manera rutinaria en inmunología aplicada (véase Harlow y Lane, 1988, "Antibodies: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Se reconoce que, en algunos casos, un ligando o agente puede perder eficacia o funcionalidad tras la conjugación en función de, por ejemplo, el procedimiento de conjugación o el grupo químico utilizado en el mismo. Sin embargo, dada la gran variedad de métodos para la conjugación, la persona experta es capaz de encontrar un método de conjugación que no afecte, o mínimamente, a la eficacia o la funcionalidad de las entidades que se van a conjugar. Los métodos adecuados para la conjugación de un ligando con un agente o portador incluyen, por ejemplo, la conjugación con carbodiimida (Bauminger y Wilchek, 1980, Meth. Enzymol. 70: 151-159). Alternativamente, un agente o portador se puede acoplar con un ligando como se describe por Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7269-7273 (1996); y Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1794-1799 (1998). Otros métodos para conjugar que se pueden usar adecuadamente son, por ejemplo, la oxidación con peryodato de sodio seguida de una alquilación reductiva con reactivos apropiados y la reticulación con glutaraldehído. Un método de conjugación particularmente ventajoso se puede aplicar cuando tanto el ligando como el agente o portador son polipéptidos. En tales casos, las dos entidades se pueden sintetizar como una cadena polipeptídica única que comprende las secuencias de aminoácidos tanto del ligando como del agente o portador peptídico. Además de la unión covalente, en un conjugado según la divulgación, el agente o portador también se puede conjugar directamente con la molécula de ligando por interacción proteína-proteína no específica o específica, enlace no covalente y/o enlace químico de coordinación, donde esta conjugación puede efectuarse opcionalmente a través de un separador o conector que está unido al agente y al ligando.

[0026] En otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado de la invención tal como se ha definido anteriormente, para usar en el tratamiento y/o la prevención de un trastorno del SNC. Según la invención, se usa un conjugado de la invención en la producción de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno del SNC. De forma similar, la divulgación se refiere a métodos para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno del SNC, donde se administra una dosis efectiva de un conjugado de la invención a un sujeto que necesita el mismo. El sujeto que necesita el tratamiento o la prevención de un trastorno del SNC puede ser un vertebrado, un mamífero o, preferiblemente, un humano.

Enfermedades del SNC y trastornos relacionados

[0027] Los párrafos siguientes proporcionan una descripción de las varias patologías del SNC y enfermedades asociadas o trastornos relacionados que, en varias formas de realización de la invención, se pueden tratar y/o prevenir con los conjugados de la invención que comprenden un agente activo dirigido a transportadores de GSH.

[0028] En una forma de realización preferida de la invención, la patología del SNC es una perteneciente a un trastorno neurodegenerativo, tal como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH), la esclerosis múltiple (EM), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), accidentes cerebrovasculares (ACV): derrame cerebral isquémico, hemorragia intracerebral (HIC) o hemorragia subaracnoidea (ESA)), demencia vascular, traumatismo cerebral (traumatismo craneoencefálico), lesión de la médula espinal, alcoholismo, enfermedades priónicas: enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), encefalopatía espongiiforme bovina (EEB).

[0029] En una forma de realización de la invención, la enfermedad de Alzheimer se trata con uno de los siguientes fármacos o compuestos dirigidos en base a inhibidores de la colinesterasa: Exelon (rivastigmina), Razadyne ER (galantamina), Debio 9902 SR, NGX267; antagonistas de NMDA: Namenda/Axura/Ebixa (memantina), Dimebon (dimebolina), NP-0361; agonista nicotínico alfa-7 de la acetilcolina: ABT-089; AZD-0328, R-4996/MEM-63908, EVP-6124; inmunoterapias pasivas: Gammagard (IVIG), bapineuzumab (AAB-001), LY2062430, PF-4360365 (RN1219), AAB-002, ACU-5A5, R-1450, ACI-01-Ab7, BAN-2401; inhibidores de la gamma-secretasa/moduladores de la gamma-secretasa: Flurizan (tarenflurbil; R-flurbiprofeno), LY-450139, GSI-953, MK-0752; inhibidores de beta-secretasa: CTS-21166; anti-TNF: Enbrel (etanercept), certolizumab pegol (CDP870, nombre comercial Cimzia), Remicade (infliximab) o Humira (adalimumab); relacionados con la insulina: Avandia (rosiglitazona), TTP-488 (inhibidor de RAGE), NGX-96992, enzima de degradación de la insulina, Ketasyn (AC-1202), SRT-501; inhibidores de Tau/GSK3: NP031112, Dimebon; cascada de coagulación: antagonista de PAI-1; quelantes metálicos: PBT2;

estatinas: Lipitor (atorvastatina), Zocor (simvastatina); hormonales: Evista (raloxifeno); 5-HT/GABA: lecozotán/lecozotán SR, PRX-03140, MK-0249, 742457 (SB-742457); otros antiamiloides: ELND005 (scyllo-inositol; AZD-103), curcumina, caprospinol (SP-233); péptido rompedor de láminas beta (Leu-Pro-Phe-Phe-Asp o LPFFP, Ac-LPFFP-NH₂ como se describe en la patente de EE.UU. nros. 5,948,763 y 6,462,171, o Leu-Pro-Tyr-Phe-Asp-amida o LPYFDa como se describe en Juhasz et al., 2009, J. Alzheimers Dis. 16: 189-196); o inhibidores de BACE1: anticuerpos anti-BACE1 o fragmentos de los mismos: o neprilisina.

[0030] En una forma de realización preferida de la invención, la patología del SNC es una perteneciente a un trastorno periférico con un componente del SNC, tal como un choque séptico, metástasis cerebral, encefalopatía hepática, hipertensión (diabética), (micro)angiopatía diabética, enfermedad del sueño, enfermedad de Whipple, distrofia muscular de Duchenne (DMD), aspartilglucosaminuria, enfermedad del almacenamiento de ésteres de colesterol, enfermedad de Wolman, cistinosis, enfermedad de Danon, enfermedad de Fabry, lipogranulomatosis de Farber, enfermedad de Farber, fucosidosis, galactosialidosis tipos I/II, enfermedad de Gaucher tipos I/II/III, enfermedad de Gaucher, leucodistrofia de células globoides, enfermedad de Krabbe, enfermedad del almacenamiento de glucógeno II, enfermedad de Pompe, gangliosidosis GM1 tipos I/II/III, gangliosidosis GM2 tipo I, enfermedad de Tay Sachs, gangliosidosis GM2 tipo II, enfermedad de Sandhoff, gangliosidosis GM2, alfa-manosidosis tipos I/II, manosidosis, leucodistrofia metacromática, mucopolipidosis tipo I, sialidosis tipos I/II mucopolipidosis tipos II/III enfermedad de las células I, mucopolipidosis tipo IIIC polidistrofia de pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis tipo I, mucopolisacaridosis tipo II, síndrome de Hunter, mucopolisacaridosis tipo IIIA, síndrome de Sanfilippo, mucopolisacaridosis tipo IIIB, mucopolisacaridosis tipo IIIC, mucopolisacaridosis tipo IIID, mucopolisacaridosis tipo IVA, síndrome de Morquio, mucopolisacaridosis tipo IVB síndrome de Morquio, mucopolisacaridosis tipo VI, mucopolisacaridosis tipo VII, síndrome de Sly, mucopolisacaridosis tipo IX, deficiencia múltiple de sulfatasas, lipofuscinosis ceroide neuronal, enfermedad de Batten CLN1, enfermedad de Niemann-Pick tipos A/B, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Niemann-Pick tipo C1, enfermedad de Niemann-Pick tipo C2, picnodisostosis, enfermedad de Schindler tipos VII, enfermedad de Schindler, enfermedad por almacenamiento de ácido siálico, y (pre)eclampsia.

[0031] En otra forma de realización de la invención, las enfermedades por almacenamiento lisosómico (EAL) se tratan con uno de los siguientes fármacos o compuestos dirigidos en base a fármacos y compuestos que causan una reducción de materiales lisosómicos almacenados como glucocerebrósido, esfingomielina, ceramida, gangliósido GM1, gangliósido GM2, globósido, galactosilceramida, sulfato de dermatano, sulfato de heparano, sulfato de queratano, sulfátidos, mucopolisacáridos, sialiloligosacáridos, glicoproteínas, sialiloligosacáridos, glicolípidos, globotriaosilceramida, glucopéptidos O-enlazados, glucógeno, ácido siálico libre, fucoglicolípidos, fucosiloligosacáridos, manosiloligosacáridos, aspartilglucosamina, ésteres de colesterol, triglicéridos y pigmentos de lipofuscina ceroide en enfermedades de almacenamiento lisosómico, como la enfermedad de Gaucher (glucocerebrósido almacenado) usando una terapia sustitutiva enzimática dirigida con beta-glucocerebrosidasa (por ejemplo, imiglucerasa (Cerezyme comercializada por Genzyme) o velaglucerasa (en desarrollo por Shire), beta-glucocerebrosidasa activada génicamente, o con inhibición de sustrato de la glucosilceramida sintasa con iminoazúcares (por ejemplo, miglustat (Zavesca comercializado por Actelion) = N-butil-desoxinojirimicina (NB-DNJ), N-butil-galactosil-desoxinojirimicina (NB-DGJ), N-(5-adamantan-1-il-metoxipentil)-desoxinojirimicina (AMP-DNJ), N-(5-adamantan-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina (AMP-DNM), o con análogos de glucosilceramida (por ejemplo, Genz 112638: d-treo-etilendioxifenil-2-palmitoilamino-3-pirrilidino-propanol), o con tratamiento con chaperonas (por ejemplo, tartrato de isofagomina, AT2101, (que se va a comercializar como Plicera™ por Amicus Therapeutics, nombre químico: (3R, 4R, 5R)-3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-piperidina); Fabry (globotriaosilceramida almacenada) usando una terapia sustitutiva enzimática dirigida con alfa-galactosidasa A (por ejemplo, algalsidasa alfa (Replagal comercializada por Shire), algalsidasa beta (Fabrazyme comercializada por Genzyme), o con inhibición de sustrato de glucosilceramida sintasa con iminoazúcares (por ejemplo, miglustat (Zavesca comercializado por Actelion) = n-butil-desoxinojirimicina (NB-DNJ), N-butil-galactosil-desoxinojirimicina (NB-DGJ); N-(5-adamantan-1-il-metoxipentil) (AMP-DNJ), AMP-DNM o MZ-21 y MZ-31 de Macrozyme), o con análogos de la glucosilceramida (por ejemplo, Genz 112638: d-treo-etilendioxifenil-2-palmitoilamino-3-pirrilidino-propanol), o con tratamiento con chaperonas (AT1001, clorhidrato de migalastat (que se va a comercializar como Amigal™ por Amicus Therapeutics con los nombres químicos 3,4,5-piperidinetriol, 2-(hidroximetil), clorhidrato, clorhidrato de (2R,3S,4R,5S)-, (+)-(2R,3S,4R,5S)-2-(hidroximetil)piperidina-3,4,5-triol, clorhidrato de 1,5-dideoxi-1,5-imino-D-galactitol); MPS I (Hurler-Scheie, sulfato de dermatano almacenado, sulfato de heparano) usando una terapia sustitutiva enzimática dirigida con alfa-L-iduronidasa (por ejemplo, laronidasa (Aldurazyme comercializada por Genzyme/Biomarin); MPS II (Hunter, sulfato de dermatano, sulfato de heparano almacenados) con terapia sustitutiva enzimática dirigida con iduronato-2-sulfatasa (por ejemplo, idursulfasa (Elapraxe comercializada por Shire); MPS III A (Sanfilippo A, sulfato de heparano almacenado) usando una terapia sustitutiva enzimática dirigida con heparán sulfamidasa; MPS III B (Sanfilippo B, sulfato de heparano almacenado) usando una terapia sustitutiva enzimática dirigida con alfa-N-acetilglucosaminidasa; MPS III C (Sanfilippo C, sulfato de heparano almacenado) usando una terapia sustitutiva enzimática dirigida con alfa-glucosaminidasa N-acetiltransferasa; MPS III D (Sanfilippo D, sulfato de heparano almacenado) usando una terapia sustitutiva enzimática dirigida con N-acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa; MPS IV (Morquio, sulfato de queratano almacenado) usando una terapia sustitutiva enzimática dirigida con N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa; MPS VI (Maroteaux-Lamy, glicosaminoglicano (GAG) almacenado) usando una terapia sustitutiva enzimática dirigida con arilsulfatasa B (por ejemplo, galsulfasa (Naglazyme

comercializada por Biomarin); MPS VII (Sly, sulfato de dermatano, sulfato de heparano almacenados) usando una terapia sustitutiva enzimática dirigida con beta-glucuronidasa; Krabbe (galactosilceramida almacenada) usando una terapia sustitutiva enzimática dirigida con galactocerebrosidasa; Niemann-Pick A y B (esfingomielina almacenada) usando una terapia sustitutiva enzimática dirigida con esfingomielinasa ácida (en desarrollo por Genzyme);
 5 Niemann-Pick C (esfingomielina almacenada) usando una inhibición de sustrato de la glucosilceramida sintasa dirigida con miglustat (Zavesca comercializada por Actelion) = N-butil-desoxinojirimicina (NB-DNJ) o ciclodextrinas (especialmente hidroxipropil-beta-ciclodextrina); leucodistrofia metacromática (sulfátidos almacenados) usando una terapia sustitutiva enzimática dirigida con arilsulfatasa A; mucopolidosis II/III (sialiloligosacáridos, glicoproteínas, glicolípidos almacenados) usando una terapia sustitutiva enzimática dirigida con UDP-N-acetilglucosamina o la
 10 enzima lisosómica N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa (GNPT); gangliosidosis GM1 (gangliósido GM1 almacenado) usando una terapia sustitutiva enzimática dirigida con beta-galactosidasa; enfermedad de Sandhoff (gangliosidosis GM2 con gangliósido GM2 almacenado) usando una terapia sustitutiva enzimática dirigida con beta-hexosaminidasa A, o una inhibición de sustrato de la glucosilceramida sintasa usando iminoazúcares (por ejemplo, miglustat (Zavesca comercializado por Actelion) = N-butil-desoxinojirimicina (NB-DNJ)); enfermedad de Tay Sachs
 15 (gangliósido GM2) usando una terapia sustitutiva enzimática dirigida con alfa-hexosaminidasa A o una inhibición de sustrato de la glucosilceramida sintasa usando iminoazúcares (por ejemplo, miglustat (Zavesca comercializado por Actelion) = N-butil-desoxinojirimicina (NB-DNJ)).

[0032] En otra forma de realización preferida de la invención, la patología del SNC es uno perteneciente a los trastornos neuropsiquiátricos, tales como depresión (por ejemplo, modificada usando agonistas del receptor mineralcorticoide liposómico dirigidos al cerebro como la fludrocortisona, la desoxicorticosterona o la aldosterona, reduciendo así los efectos secundarios cardiovasculares periféricos), autismo, ansiedad, trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), adicción y otros trastornos relacionados con sustancias, lupus eritematoso sistémico neuropsiquiátrico, trastorno bipolar, trastornos alimenticios, esquizofrenia y otras psicosis; u otros trastornos del SNC, tales como tumores cerebrales primarios, epilepsia/convulsiones, migraña y otras cefaleas (en racimos, vascular, tensional), narcolepsia, insomnio (y otros trastornos del sueño), síndrome de fatiga crónica, mal de montaña, obesidad, encefalitis bacteriana y viral, meningitis bacteriana y viral, demencia relacionada con el SIDA; o trastornos relacionados con la angiogénesis, tales como tumores vasculares, vitreoretinopatía proliferativa, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, aterosclerosis, hiperestimulación ovárica, psoriasis, endometriosis asociada a la neovascularización, reestenosis posterior a la angioplastia de globo, sobreproducción de tejido cicatricial, enfermedad vascular periférica, hipertensión, vasculitis inflamatoria, enfermedad de Reynaud, fenómeno de Reynaud, aneurismas, reestenosis arterial, tromboflebitis, linfangitis, linfedema, cicatrización de heridas y reparación tisular, lesión por isquemia-reperfusión, angina, infartos de miocardio, enfermedades crónicas del corazón, insuficiencia cardíaca tal como la insuficiencia cardíaca congestiva, degeneración macular relacionada con la edad y osteoporosis.

35 Dirección a y/o a través de las barreras entre la sangre y un tejido

[0033] En otro aspecto de la divulgación, se proporciona un método de administración dirigida de fármacos de una cantidad eficaz de un agente, o un portador farmacéutico aceptable que comprende un agente, a un sitio diana que está protegido por barreras específicas entre la sangre y un tejido como por ejemplo, el SNC, la barrera hematoencefálica (BHE), la retina y los testículos, donde: a) el agente o el portador farmacéutico aceptable se conjuga con un ligando, que facilita la unión específica a y la internalización por un receptor de absorción de GSH de internalización del sitio diana, formando así el conjugado tal como se ha definido anteriormente; y b) el agente se administra en el sitio diana dentro de un periodo de tiempo de aproximadamente el día 1 a aproximadamente el día 5 después de la administración a una persona que lo necesita. En una forma de realización preferida, la barrera entre la sangre y un tejido, por ejemplo, la barrera hematoencefálica en el método no se interrumpe con la
 40 administración de agentes que interrumpen la barrera entre la sangre y un tejido. En otra forma de realización preferida, el periodo de tiempo es de aproximadamente el día 1 a aproximadamente el día 7, más preferiblemente de aproximadamente el día 1 a aproximadamente el día 10, aún más preferiblemente de aproximadamente el día 1 a aproximadamente el día 14, más preferiblemente de aproximadamente el día 1 a aproximadamente el día 21.

[0034] Los párrafos siguientes se refieren a varias formas de realización de la invención relativas a la dirección activa a los sitios diana protegidos por barreras entre la sangre y un tejido específico como, por ejemplo, el SNC, la barrera hematoencefálica (BHE), la retina y los testículos, por transcitosis mediada por receptores. En una forma de realización preferida de la invención, el transportador de GSH que media al menos una de entre la endocitosis y la transcitosis se localiza en (el lado luminal de) los capilares del cerebro. En general, sin querer vincularse a ninguna teoría, la transcitosis mediada por receptores ocurre en tres pasos: endocitosis mediada por receptores del agente en el lado luminal (sangre), el movimiento a través del citoplasma endotelial y la exocitosis del fármaco en el lado abluminal (cerebro) del endotelio capilar cerebral. Tras la internalización del receptor-ligando, se forman vesículas recubiertas de clatrina, que tienen aproximadamente 120 nm de diámetro. Estas vesículas pueden transportar su contenido al otro lado de la célula o entrar en una vía que lleva a la degradación de proteínas. De hecho, se han identificado al menos dos vías importantes para degradar proteínas, incluyendo la vía lisosómica y de la ubiquitina-proteasoma. Por lo tanto, para escapar del sistema endosómico□lisosómico, se han aplicado
 50
 55
 60

mecanismos para asegurar la liberación del fármaco en el citosol. Estos incluyen la aplicación de liposomas sensibles al pH o moléculas catiónicas. Sin embargo, con o sin la aplicación de mecanismos de escape lisosómico, se ha demostrado que la administración de proteínas al cerebro es eficaz. Por lo tanto, la transcitosis mediada por receptores permite la dirección específica de moléculas de fármaco o partículas portadoras de fármaco más grandes (tales como liposomas, sistemas poliméricos, nanopartículas) al cerebro. En una forma de realización preferida, el transportador de GSH media al menos una de entre la endocitosis y la transcitosis, el ligando y el portador farmacéutico aceptable se seleccionan para evitar la degradación lisosómica del agente en la célula.

Terapia génica

[0035] Algunos aspectos de la divulgación conciernen el uso de vectores de expresión que comprenden las secuencias de nucleótidos que codifican un agente que incluye un oligo o polinucleótido tal como se ha definido anteriormente, donde el vector es un vector que es adecuado para la terapia génica. Se describen Vectores que son adecuados para la terapia génica en Anderson 1998, Nature 392: 25-30; Walther y Stein, 2000, Drugs 60: 249-71; Kay et al., 2001, Nat. Med. 7: 33-40; Russell, 2000, J. Gen. Virol. 81: 2573-604; Amado y Chen, 1999, Science 285: 674-6; Federico, 1999, Curr. Opin. Biotechnol. 10: 448-53; Vigna y Naldini, 2000, J. Gene Med. 2: 308-16; Marin et al., 1997, Mol. Med. Today 3: 396-403; Peng y Russell, 1999, Curr. Opin. Biotechnol. 10: 454-7; Sommerfelt, 1999, J. Gen. Virol. 80: 3049-64; Reiser, 2000, Gene Ther. 7: 910-3; y referencias citadas en los mismos. Vectores especialmente adecuados para la terapia génica incluyen vectores adenovirales y de virus adenoasociados (AAV). Estos vectores infectan un amplio número de tipos celulares en división y que no están en división. Además, los vectores adenovirales son capaces de altos niveles de expresión transgénica. Sin embargo, debido a la naturaleza episómica de los vectores adenovirales y AAV después de la introducción en la célula, estos vectores virales son más adecuados para usos terapéuticos que requieren solo la expresión transitoria del transgén (Russell, 2000, J. Gen. Virol. 81: 2573-2604) como se ha indicado anteriormente. Los vectores adenovirales preferidos se modifican para reducir la respuesta del huésped como revisa Russell (2000, supra).

[0036] Generalmente, los vectores para la terapia génica serán como los vectores de expresión descritos anteriormente en el sentido en que comprenden la secuencia de nucleótidos que codifica el agente que se va a expresar, por lo cual la secuencia de nucleótidos está operativamente unida a las secuencias reguladoras apropiadas como se ha indicado anteriormente. Tal secuencia reguladora comprenderá al menos una secuencia promotora. Como se utiliza en la presente, el término "promotor" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que funciona para controlar la transcripción de uno o más genes, situados aguas arriba con respecto a la dirección de la transcripción del sitio de iniciación de la transcripción del gen, y se identifica estructuralmente por la presencia de un sitio de unión para una ARN-polimerasa dependiente del ADN, sitios de iniciación de la transcripción y cualquier otra secuencia de ADN, incluyendo, pero de forma no limitativa, sitios de unión de factores de transcripción, sitios de unión a proteínas represoras y activadoras, y cualquier otra secuencia de nucleótidos conocida por una persona experta en la técnica para actuar directa o indirectamente para regular la cantidad de transcripción del promotor. Un promotor "constitutivo" es un promotor que está activo en muchas condiciones fisiológicas y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que está regulado en función de las condiciones fisiológicas o de desarrollo. Un promotor "específico de tejido" solo está activo en tipos específicos de células/tejidos diferenciados. Los promotores adecuados para la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de los vectores para la terapia génica incluyen, por ejemplo, el promotor temprano-intermedio de los citomegalovirus (CMV), promotores virales de repetición terminal larga (LTR), tal como el del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV), del virus del sarcoma de Rous, o el HTLV-1, el promotor temprano del virus simiano 40 (SV 40) y el promotor de la timidina quinasa del virus del herpes simple.

[0037] Se han descrito varios sistemas promotores inducibles que se pueden inducir por la administración de compuestos orgánicos o inorgánicos pequeños. Tales promotores inducibles incluyen aquellos controlados por metales pesados, tales como el promotor de metalotioneína (Brinster et al. 1982 Nature 296: 39-42; Mayo et al. 1982 Cell 29: 99-108), RU-486 (un antagonista de la progesterona) (Wang et al. 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 8180-8184), esteroides (Mader y White, 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5603-5607), tetraciclina (Gossen y Bujard 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551; patente de EE.UU. n.º 5,464,758; Furth et al. 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9302-9306; Howe et al. 1995 J. Biol. Chem. 270: 14168-14174; Resnitzky et al. 1994 Mol. Cell. Biol. 14: 1669-1679; Shockett et al. 1995 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6522-6526) y el sistema tTAER que se basa en el transactivador multiquimérico compuesto por un polipéptido tetR, como dominio de activación de VP16, y un dominio de unión de ligandos de un receptor de estrógenos (Yee et al., 2002, US 6,432,705).

[0038] El vector para terapia génica puede comprender opcionalmente una segunda o una o más secuencias de nucleótidos adicionales codificantes para una segunda proteína u otras adicionales. La segunda proteína u otras adicionales pueden ser una proteína marcadora (seleccionable) que permita la identificación, selección y/o cribado de células que contengan el constructo de expresión. Proteínas marcadoras adecuadas para este fin son, por ejemplo, proteínas fluorescentes tales como, por ejemplo, la GFP verde, y los genes marcadores seleccionables timidina quinasa del HSV (para la selección en medio HAT), higromicina B fosfotransferasa bacteriana (para la selección en higromicina B), Tn5 aminoglucósido fosfotransferasa (para la selección en G418), y dihidrofolato

reductasa (DHFR) (para la selección en metotrexato), CD20, el gen del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad. Se proporcionan fuentes para obtener estos genes marcadores y métodos para su uso en Sambrook y Russel (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (3ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

5 [0039] Alternativamente, la segunda secuencia de nucleótidos u otras adicionales pueden codificar una proteína que proporciona un mecanismo a prueba de fallos que permite curar a una persona a partir de las células transgénicas, si se considera necesario. Tal secuencia de nucleótidos, a menudo referida como un gen suicida, codifica una proteína que es capaz de convertir un profármaco en una sustancia tóxica que es capaz de matar las células transgénicas en las que se expresa la proteína. Los ejemplos adecuados de tales genes suicidas incluyen, por ejemplo, el gen citosina desaminasa de *E. coli* o uno de los genes de timidina quinasa del virus del herpes simple, citomegalovirus y el virus de la varicela-zoster, en cuyo caso se puede usar ganciclovir como profármaco para matar las células transgénicas IL-10 en la persona (véase, por ejemplo, Clair et al., 1987, Antimicrob. Agents Chemother. 31: 844-849). Los vectores para terapia génica se formulan preferiblemente en una composición farmacéutica que comprende un soporte farmacéutico adecuado tal y como se define a continuación.

15 Anticuerpos

[0040] Anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden ser una parte componente de los conjugados o agentes de la divulgación. Los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos pueden ser una parte componente de los conjugados de la invención. Preferiblemente el anticuerpo o el fragmento del mismo es un anticuerpo monoclonal (mAb). Se pueden preparar mAb para componentes del complemento usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen el uso de tecnologías de hibridomas, recombinante y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando técnicas de hibridoma que incluyen aquellas conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, et al., en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). Para tratar seres humanos, los mAb anti-complemento se usarían preferiblemente como anticuerpos quiméricos, desimmunizados, humanizados o humanos. Tales anticuerpos pueden reducir la inmunogenicidad y evitar así una respuesta de anticuerpos anti-ratón humanos (HAMA). Es preferible que el anticuerpo sea IgG4, IgG2 u otro IgG o IgM genéticamente mutado que no aumente la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (S.M. Canfield y S.L. Morrison, J. Exp. Med., 1991: 173: 1483-1491) y la citólisis mediada por el complemento (Y.Xu et al., J. Biol. Chem., 1994: 269: 3468-3474; V.L. Pulito et al., J. Immunol., 1996,156: 2840-2850). Los anticuerpos quiméricos se producen por procesos recombinantes bien conocidos en la técnica y tienen una región variable animal y una región constante humana. Los anticuerpos humanizados tienen un grado superior de secuencias peptídicas humanas que los anticuerpos quiméricos. En un anticuerpo humanizado, solo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que son responsables de la unión del antígeno y la especificidad derivan de animales y tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente al anticuerpo del animal, y sustancialmente todas las partes restantes de la molécula (excepto, en algunos casos, partes pequeñas de las regiones marco en la región variable) derivan de humanos y corresponden en la secuencia de aminoácidos a un anticuerpo humano. Véase L. Riechmann et al., Nature, 1988, 332: 323-327; G. Winter, patente de EE.UU. n.º 5,225,539; C. Queen et al., U.S. 5,530,101. Los anticuerpos desimmunizados son anticuerpos donde se han eliminado los epítopos de las células T y B, como se describe en WO9852976. Tienen una inmunogenicidad reducida cuando se aplican *in vivo*. Los anticuerpos humanos se pueden producir de diferentes maneras, incluyendo mediante el uso de bibliotecas de expresión de inmunoglobulinas humanas (Stratagene Corp., La Jolla, California) para producir fragmentos de anticuerpos humanos (VH, LV, Fv, Fd, Fab o (Fab)², y usando estos fragmentos para construir anticuerpos humanos enteros usando técnicas similares a aquellas para producir anticuerpos quiméricos. Los anticuerpos humanos también se pueden producir en ratones transgénicos con un genoma de inmunoglobulina humana. Tales ratones están disponibles de Abgenix, Inc., Fremont, California, y Medarex, Inc., Annandale, Nueva Jersey. También se pueden crear moléculas de unión a péptidos de cadena única donde están conectadas las regiones Fv de la cadena pesada y la ligera. Los anticuerpos monocatenarios ("ScFv") y el método para su construcción se describen en la patente de EE.UU. n.º 4,946,778. Alternativamente, se pueden construir y expresar Fab por medios similares (M.J. Evans et al., J. Immunol. Meth., 1995; 184: 123-138). Otra clase de anticuerpos que se puede usar en el contexto de la presente invención son anticuerpos de cadena pesada y derivados de los mismos. Tales anticuerpos de cadena pesada monocatenarios ocurren naturalmente, por ejemplo, en *Camelidae* y sus dominios variables aislados son referidos generalmente como "dominios VHH" o "nanocuerpos". Métodos para obtener anticuerpos de cadena pesada y los dominios variables se proporcionan entre otras cosas en las siguientes referencias: WO 94/04678, WO 95/04079, WO 96/34103, WO 94/25591, WO 99/37681, WO 00/40968, WO 00/43507, WO 00/65057, WO 01/40310, WO 01/44301, EP 1134231, WO 02/48193, WO 97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016, WO 03/055527, WO 03/050531, WO 01/90190, WO 03/025020, WO 04/041867, WO 04/041862, WO04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551. Todos los anticuerpos completamente y parcialmente humanos son menos inmunogénicos que los mAb completamente murinos (o mAb de otros animales no humanos), y los fragmentos y anticuerpos monocatenarios son también menos inmunogénicos. Por lo tanto, es menos probable que todos estos tipos de anticuerpos provoquen una respuesta alérgica o inmunitaria. En consecuencia, son más adecuados para la administración *in vivo* en seres humanos que los anticuerpos completamente animales,

especialmente cuando es necesaria una administración repetida o a largo plazo. Además, el tamaño menor del fragmento del anticuerpo puede ayudar a mejorar la biodisponibilidad del tejido, que puede ser crítica para una mejor acumulación de dosis en indicaciones de una enfermedad aguda, tal como el tratamiento tumoral o algunas infecciones virales.

5 Composiciones farmacéuticas

[0041] La invención se refiere además a un producto farmacéutico que comprende como sustancia activa un conjugado como se ha definido anteriormente en la presente. La composición comprende preferiblemente al menos un portador farmacéuticamente aceptable (distinto al portador del conjugado) además de la sustancia activa (el conjugado). En algunos métodos, el conjugado comprende un polipéptido o anticuerpo de la invención purificado de cultivos celulares de mamífero, de insecto o microbianos, de leche de mamíferos transgénicos u otra fuente se administra en forma purificada junto con un soporte farmacéutico como una composición farmacéutica. Se describen métodos para producir composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos en las patentes de EE.UU. nros. 5,789,543 y 6,207,718. La forma preferida depende del modo deseado de administración y el uso terapéutico. El soporte farmacéutico puede ser cualquier sustancia no tóxica compatible adecuada para administrar los polipéptidos, anticuerpos o vectores para terapia genética al paciente. Se pueden usar agua esterilizada, alcohol, grasas, ceras y sólidos inertes como portador. Adyuvantes farmacéuticamente aceptables, amortiguadores, dispersantes y similares, también se pueden incorporar en las composiciones farmacéuticas. La concentración del conjugado de la invención en la composición farmacéutica puede variar ampliamente, es decir, de menos de aproximadamente un 0,1% en peso, siendo normalmente al menos de aproximadamente un 1% en peso, a tanto como un 20% en peso o más. Para la administración oral, la sustancia activa se puede administrar en formas de dosificación sólidas, tales como cápsulas, pastillas y polvos, o en formas de dosificación líquidas, tales como elixires, jarabes y suspensiones. El/Los componente(s) activo(s) se puede(n) encapsular en cápsulas de gelatina junto con ingredientes inactivos y portadores en polvo, tales como glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, almidón, celulosa o derivados de la celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina sódica, talco, carbonato de magnesio y similares. Ejemplos de ingredientes inactivos adicionales que se pueden añadir para proporcionar un color, un gusto, una estabilidad, una capacidad amortiguadora, una dispersión deseables u otras características deseables conocidas, son el óxido de hierro rojo, el gel de sílice, el lauril sulfato de sodio, el dióxido de titanio, la tinta blanca comestible y similares. Se pueden usar diluyentes similares para hacer pastillas comprimidas. Tanto las pastillas como las cápsulas se pueden fabricar como productos de liberación prolongada para proporcionar una liberación continua de medicación durante un periodo de horas. Las pastillas comprimidas pueden estar recubiertas de azúcar o recubiertas de una película para ocultar cualquier sabor desagradable y proteger la pastilla de la atmósfera, o con cubierta entérica para la desintegración selectiva en el tracto gastrointestinal. Las formas de dosificación líquidas para la administración oral pueden contener colorantes y saborizantes para aumentar la aceptación del paciente. Los conjugados de la invención se administran preferiblemente por vía parenteral. La preparación con los conjugados para la administración parenteral debe ser estéril. La esterilización se realiza fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes de o después de la liofilización y la reconstitución. La vía parenteral para la administración de los conjugados está de acuerdo con los métodos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión por las vías intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intralesional, intracraneal, intratecal, transdérmica, nasal, bucal, rectal o vaginal. El conjugado se administra continuamente por infusión o por inyección en bolo. Se podría preparar una composición típica para la infusión intravenosa que contuviera de 10 a 500 ml de NaCl al 0,9% o de glucosa al 5% estériles suplementadas opcionalmente con solución de albúmina al 20% y la dosis requerida del conjugado. Se prepararía una composición farmacéutica típica para la inyección intramuscular que contenga, por ejemplo, 1-10 ml de agua amortiguada estéril y la dosis requerida del conjugado de la invención. Métodos para preparar composiciones administrables parenteralmente se conocen bien en la técnica y se describen con más detalle en varias fuentes, incluyendo, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (15ª ed., Mack Publishing, Easton, PA, 1980).

[0042] Para usos terapéuticos, las composiciones farmacéuticas se administran a un paciente que sufre una infección viral o una condición asociada en una cantidad suficiente para reducir la gravedad de los síntomas y/o prevenir o detener el desarrollo adicional de síntomas. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una "dosis efectiva terapéuticamente" o "profilácticamente". Tales dosificaciones eficaces dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general de salud del paciente.

[0043] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usa en su sentido no limitativo para referirse a que se incluyen los artículos posteriores a la palabra, pero no se excluyen los artículos no específicamente mencionados. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de uno/a de los elementos esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" significa por tanto normalmente "al menos uno/a".

[0044] Los ejemplos siguientes se ofrecen solo para fines ilustrativos y no se destinan a limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Descripción de las figuras

[0045]

5 La figura 1 muestra imágenes representativas de la absorción de glutatión-PEG-liposomas (marcados con Rho-PE) en BCEC. Se muestra la absorción de liposomas dirigidos a GSH por células endoteliales capilares bovinas (BCEC) en monocultivo de BCEC (A) y en el modelo de cocultivo de BHE (B). Las micrografías muestran la absorción de liposomas dirigidos a GSH (rojo) por cultivos de BCEC (núcleos contrateñidos en azul) después de tiempos de incubación de ½ h (A) y 2 h (B). La incubación del monocultivo de BCEC (C) y en el modelo de cocultivo de BHE (D) con liposomas no dirigidos muestra claramente una ausencia de señal roja en o alrededor de las células.

10 La figura 2 muestra una imagen de la dirección específica al cerebro de hámster de glutatión-PEG-liposomas (en el régimen de dosificación de 50 mg/kg/día), 3 días después de la última inyección en bolo intravenosa diaria durante 12 días consecutivos. La micrografía anterior muestra una señal de fluorescencia de los liposomas dirigidos a GSH principalmente perivascular.

Ejemplos15 Ejemplo de referencia 1Conjugación de agentes con ligandos específicos de receptor

20 [0046] Como ejemplo de conjugación de los agentes con GSH, se describe el método preferido de conjugación de GSH con fármacos proteicos. Se aplica una química de conjugación similar a los otros agentes descritos en la presente y los otros derivados de GSH descritos en la presente. Para visualizar la absorción celular específica del transportador de GSH, así como la farmacocinética *in vivo* y la biodistribución de GSH conjugado a un agente hidrofílico, el GSH se marca con el colorante fluorescente hidrofílico isotiocianato de fluoresceína (FITC) o Cy5.5. Para esto, el GSH se disuelve en PBS y NaHCO₃ pH 9,0. Se añade FITC o Cy5.5 y se agita la solución, a oscuras, durante 1 h a temperatura ambiente. El exceso de FITC o Cy5.5 se elimina por centrifugación en columna (Zeba™, Pierce, Rockford, EE.UU.) después de lo cual se almacena la solución en la oscuridad a 4°C.

25 Ejemplo 2Conjugación de ligandos específicos de transportadores de GSH con nanocontenedores que contienen agentes encapsulados, y farmacocinética y farmacodinamia de los mismos.

30 [0047] Como ejemplo de nanocontenedores que contienen agentes recubiertos con ligandos específicos de transportadores de GSH, se describe el método preferido de conjugación de GSH con liposomas pegilados cargados de fármaco. Los liposomas consisten en fosfolípidos y colesterol en varias proporciones molares (por ejemplo, 2,0:1,5). Para modificar la temperatura de transición/de procesamiento y la estabilidad de las partículas en el plasma, los fosfolípidos como la 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), la dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), la fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), la fosfatidilcolina de soja (SPC), la diestearoil fosfatidilcolina (DSPC) o la fosfatidilcolina de yema de huevo (EYPC) se usan en proporciones diferentes con colesterol (Col), donde menos Col en la mezcla dará lugar a liposomas menos estables en el plasma. Los componentes se disuelven en etanol o isopropanol. Micelas que contienen DSPE-PEG-GSH (entre un 0,2 y un 10 % en moles), que se sintetiza antes de preparar los liposomas usando DSPE-PEG-MAL y soluciones frescas de glutatión reducido (proporcionando un grupo tiol reactivo a MAL en la fracción de cisteína del tripéptido) y DSPE-mPEG (PM 2000) se añade a la solución con diferentes porcentajes en moles (hasta un 5-10 % en moles en total). Alternativamente, se conjuga DSPE-PEG-GSH usando DSPE-PEG-NHS con actividad hacia los grupos amina del GSH, o se sintetiza GSH directamente a DSPE-PEG en el residuo N o C-terminal. Cuando es necesario cambiar la carga eléctrica de los liposomas, se añade dicetil fosfato (DP) o DOTAP a la mezcla. Adicionalmente, el tensioactivo no iónico polisorbato 80 (Tween 80) se puede añadir a la mezcla. Además, se pueden usar otros tensioactivos no iónicos, como Tween 20, Tween 40, Brij76, Brij78 o aquellos descritos en la patente de EE.UU. 6,288,040 (es decir, carbodiimida, n-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina, glutardioldehído, bromoziano, metaperiodato (sal de Na o sal de K), cloruro de tosilo y éster de ácido clorofórmico). La mezcla (lipídica) se inyecta en una solución acuosa que contiene el agente hidrofílico, con o sin la presencia de excipientes o solubilizantes como las ciclodextrinas. Los agentes lipofílicos se agregan a la mezcla lipídica, o se encapsulan (opcionalmente como un proceso de posfabricación en la farmacia hospitalaria), usando el procedimiento de carga activa con liposomas prerellenos con, por ejemplo, sulfato amónico o acetato de calcio. Después de agitar con vórtex, las vesículas se extruyen a través de membranas o se homogeneizan en un emulsionante. Alternativamente, se añade DSPE-PEG-GSH después de preparar los liposomas por incubación a 25°C hasta 60°C durante 2 hasta 24 horas (dependiendo de

la temperatura de transición de la mezcla lipídica y la sensibilidad a la temperatura del agente). Los liposomas se caracterizan por el tamaño de partícula medido (50-200 nm en un Malvern Zetasizer), el potencial zeta, el contenido de fosfolípidos (usando el kit Phospholipids B o sistemas de HPLC/UPLC) y el contenido peptídico (0,2-10 % en moles de GSH en base a HPLC/UPLC o un ensayo OPA de Pierce), y la carga de fármaco. Esta estrategia de atrapamiento liposómico se aplica a los agentes descritos en la presente, y una química de conjugación o de síntesis similar a los otros derivados de GSH descritos en la presente como ligandos para la dirección. Además, se aplica un atrapamiento liposómico similar a los fármacos basados en ácidos nucleicos, con un enriquecimiento adicional del atrapamiento de ácido nucleico por adición de un derivado catiónico de colesterol (DC-Col) a los liposomas, como se detalla en Gao y Huang, 1991, Biochem Biophys Res Commun. 179(1):280-5, o usando liposomas anfotéricos, como se detalla en WO2002/066012. Para visualizar la absorción celular específica de receptor, así como la farmacocinética y la biodistribución *in vivo* del GSH conjugado con el liposoma relleno con un agente, se añade 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-lisamina rodamina B sulfonil (Rho-PE) a la mezcla lipídica durante la preparación de los liposomas. Alternativamente, los liposomas se marcan con moléculas de trazador radiactivo, o el agente encapsulado es una molécula fluorescente (como Cy5.5) o un compuesto con una sonda fluorescente (como Cy5.5 o FITC) conjugada con el agente.

[0048] Por ejemplo, se encapsuló ribavirina, disuelta en PBS a 100 mg/ml a 50°C, en liposomas consistentes en DPPC (55%), colesterol (41%), rodamina-PE (0,04%) y mPEG-DSPE (4,4%), disueltos en 2-propanol, usando un emulsionante (Emulsiflex-C3). Para evaluar la influencia de la cantidad de moléculas de GSH en la capa externa de los liposomas, se prepararon porcentajes diferentes de GSH-PEG-DSPE (0-2%) mediante una postinserción de micelas de GSH-PEG-DSPE en liposomas preformados en lugar de mPEG-DSPE, proporcionando un 0 o un 0,1, un 0,2, un 0,5 o un 2% de liposomas de GSH-PEG con un contenido total de PEG de un 5%. De esta manera, los liposomas de ribavirina GSH-PEG tenían 90 nm y contenían 10 mg/ml de ribavirina (eficiencia de encapsulación de un 8-12%). Se prepararon liposomas de ribavirina GSH-PEG similares con EYPC en vez de DPPC. Se halló que las concentraciones plasmáticas máximas completas de ribavirina (encapsulada en liposomas) en los liposomas de PEG al 0% (a base de DPPC) después de una inyección intravenosa única de 50 mg/kg en ratas fueron estables durante varias horas (se estimó que la vida media fue de aproximadamente 19 horas) a alrededor de 3 milimolar y la fracción libre en plasma fue entonces de alrededor de 4 micromolar. Para los liposomas de GSH-PEG al 2% (a base de DPPC), las concentraciones plasmáticas completas fueron también de alrededor de 3 milimolar (con la misma vida media estimada), donde la fracción libre entonces estaba justo por encima de 2 micromolar. En cambio, las concentraciones de ribavirina libre en el fluido intersticial cerebral (determinado por microdiálisis cerebral) estaban justo por encima de 120 nanomolar para los liposomas de PEG al 0% y alrededor de 600 nanomolar para los liposomas de GSH-PEG al 2%. Además, el efecto de la administración al cerebro aumentada para la ribavirina libre resultó reducirse al disminuir el % de GSH en los liposomas: 450 nanomolar para el 0,5%, 250 nanomolar para el 0,2% y aproximadamente 120 nanomolar para el 0,1% de GSH, que fue de nuevo similar al 0%. Estos resultados indican que la adición de GSH a los liposomas pegilados aumenta la administración de fármaco libre a través de la barrera hematoencefálica de una manera dependiente del GSH, con un factor de aproximadamente 5 veces. De relevancia es que el área bajo la curva de las concentraciones plasmáticas completas de ribavirina para las diferentes formulaciones (GSH al 0-2%) no fue significativamente diferente. En cambio, la concentración plasmática completa de ribavirina (encapsulada en liposomas) en liposomas a base de EYPC (de nuevo después de una inyección intravenosa única de 50 mg/kg en ratas) se halló que alcanzaba el valor máximo a solo 1 milimolar y que descendía rápidamente (con una vida media de aproximadamente 3 horas), sin diferencia observada entre GSH al 0 y al 2% en la superficie externa de los liposomas. Al mismo tiempo, se halló que la fracción libre de ribavirina era de alrededor de 45 micromolar (valor máximo) y descendía a la misma velocidad que la concentración plasmática completa, de nuevo sin diferencia entre GSH al 0 y al 2% en la superficie externa de los liposomas. Estos resultados indican que los liposomas a base de DPPC tienen un tiempo de circulación largo (y ralentizan la liberación de ribavirina) y los liposomas a base de EYPC tienen un tiempo de circulación corto (y una liberación rápida de ribavirina).

[0049] Como otro ejemplo, los liposomas de doxorubicina pegilada (basados en Cealyx/Doxil) se modificaron para contener GSH en los extremos del PEG. Para esto, se disolvieron micelas de GSH-PEG-DSPE (5%) en una solución de 2 mg/ml de sulfato amónico a 60°C. A esta solución, se le añadió HSPC (55%) y colesterol (40%) disueltos en etanol (a 60°C) y se prepararon los liposomas por extrusión a través de filtros hasta que se obtuvieron partículas de aproximadamente 100 nm. Posteriormente, se eliminó el sulfato amónico libre por diálisis y se añadió una solución de 2 mg/ml de doxorubicina (a 60°C), para permitir que la doxorubicina se intercambie con el amonio y precipite en el núcleo del liposoma ("carga activa"). Se halló que las concentraciones plasmáticas máximas completas de doxorubicina (encapsulada en liposomas) en los liposomas pegilados no modificados (Caelyx/Doxil) después de una inyección intravenosa única de 6 mg/kg en ratas eran estables durante varias horas (se estimó que la vida media fue de aproximadamente 24 horas), donde los liposomas pegilados modificados con GSH presentaron un aclaramiento más rápido, lo que resulta en una vida media estimada de 19 horas. Los resultados muestran también que el ABC obtenida para los liposomas pegilados no modificados es aproximadamente un 50% mayor que para los liposomas pegilados modificados con GSH, y los valores Cmax son aproximadamente un 20% más altos. Posteriormente, se evaluó la eficacia de estos liposomas en ratones atímicos donde, usando un marco estereotáctico, se inyectó una suspensión de células de glioblastoma humano (U87) lentamente en el cerebro. Los ratones se dividieron en tres grupos de tratamiento: control (solución salina), doxorubicina en liposomas pegilados

no modificados (Caelyx/Doxil) y liposomas de doxorubicina pegilados modificados con GSH. Los animales recibieron 5 mg/kg i.v. dos veces a la semana. El tratamiento empezó 14 días después de la implantación de las células U87. No se observó ningún efecto adverso (EA) del tratamiento, los animales no mostraron ningún evento adverso relacionado con la inyección, ni mostraron ningún síntoma neurológico. El tratamiento con doxorubicina en liposomas pegilados modificados con GSH mostraron una fuerte reducción significativa en el crecimiento del tumor cerebral en comparación con la solución salina y los liposomas pegilados no modificados en el tiempo (ANOVA bidireccional, $p < 0,001$), y en un beneficio de supervivencia altamente significativo cuando se compara con los grupos de control (aumento del 42% en comparación con la solución salina y el 19% en comparación con liposomas pegilados no modificados). En cambio, los mismos grupos de tratamiento (10 mg/kg i.v. cada 4 días) se evaluaron en ratones desnudos con células de cáncer de mama metastásico humano (MDA-MB-231) implantado bajo la piel, y no se observó ninguna diferencia en la eficacia del tratamiento entre las dos formulaciones liposómicas; ambas fueron igualmente eficaces para reducir la carga tumoral cuando se compara con el tratamiento con vehículo.

[0050] Como otro ejemplo, el mismo proceso de producción liposómica que se ha descrito anteriormente para los liposomas pegilados modificados con GSH de doxorubicina se aplicó para encapsular las sales de hemisuccinato de metilprednisolona y desoxicorticosterona. Para esto, la solución de sulfato amónico se sustituyó por una solución de acetato de calcio, lo que lleva a altos rendimientos de encapsulación farmacológica (>70%) y formulaciones estables. Estas formulaciones se evalúan para una eficacia aumentada en enfermedades del SNC (por ejemplo, en modelos animales de esclerosis múltiple o de depresión (relacionada con el estrés)) y una reducción de efectos secundarios periféricos (principalmente cardiovasculares) que se asocian normalmente a estos esteroides.

[0051] Como ejemplo para agentes peptídicos, se aplicó el mismo proceso de producción liposómica que se ha descrito anteriormente para los liposomas de doxorubicina pegilados modificados con GSH para encapsular el péptido rompedor de láminas beta LPFFP o Ac-LPFFP-NH₂. Para esto, la solución de sulfato amónico se sustituyó por una solución de 50-100 mg/ml del péptido, lo que lleva a la encapsulación del péptido en el núcleo acuoso del liposoma con rendimientos de aproximadamente un 15% y una formulación estable. Estas formulaciones se evalúan para una eficacia aumentada en enfermedades del SNC donde está implicada la beta amiloide (por ejemplo, en los modelos de animales transgénicos de la enfermedad de Alzheimer con una formación de placas aumentada).

[0052] Como ejemplo para agentes proteicos más sensibles, como anticuerpos, enzimas y factores de crecimiento, se prefiere una temperatura de procesamiento inferior. Para esto, se disolvió entre un 95-55% de EYPC, DMPC o DPPC, y entre un 0-40% de colesterol y un 1% de mPEG-DSPE en etanol a 37°C se añadió a una solución proteica de, por ejemplo, trastuzumab, gammaquin, cerezyme, elaprased, GDNF o albúmina, se estabilizó con Tween 80 (<0,01%), y los liposomas se prepararon por extrusión a través de filtros hasta que se obtuvieron partículas de aproximadamente 100 nm. Posteriormente, micelas de GSH-PEG-DSPE al 4-8% se añadieron a 37°C durante 30 minutos hasta 2 horas a los liposomas preformados, o bien durante el proceso de producción o bien justo antes de la inyección a una persona. Alternativamente, se añadió producto liofilizado de GSH-PEG-DSPE al 5% a la solución lipídica en lugar del 1% de mPEG-DSPE. Cuando fue necesario, la proteína libre se eliminó por diálisis/diafiltración o se recapturó por columnas específicas de proteínas (por ejemplo, ProtG). La vida media de los liposomas a base de DMPC con colesterol al 40% estaba en el mismo rango que la vida media anteriormente mencionada de los liposomas a base de DPPC con colesterol al 40%. La reducción del % de colesterol al 10% acortó la vida media en plasma (y así la liberación de IgG) a aproximadamente 2 horas, donde la omisión del colesterol de la formulación redujo la vida media aún más a aproximadamente 30 minutos.

Ejemplo de referencia 3

Conjugación de GSH con un portador para fármacos a base de ácidos nucleicos

[0053] Como ejemplo de un sistema de administración no vírico para fármacos a base de ácidos nucleicos por medio de un mecanismo de absorción dirigida, se describe el método preferido de conjugación de GSH pegilado con polietilenoimina (PEI), jetPEI y similares o fragmentos de los mismos. Los complejos pegilados se preparan de la siguiente manera. El PEI se disuelve en PBS. Se añade poli(etilenglicol)- α -maleimida- ω -NHS (NHS-PEG-VS) a esta solución y se incubó a temperatura ambiente mientras se mezcla. El exceso de NHS-PEG-VS se elimina por ultrafiltración. Se usa directamente PEI-PEG-VS para la conjugación con el grupo tiol del GSH reducido.

Ejemplo de referencia 4

Conjugación de GSH con proteínas

[0054] Como ejemplo de un método de conjugación directa, se describe el método preferido de conjugación de GSH con enzimas, factores de crecimiento, anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos. Las proteínas conjugadas con GSH se preparan de la siguiente manera. Los grupos amina preferiblemente de grupos lisina se

modifican con (sulfo)-SMCC proporcionando grupos de maleimida reactiva a tiol en la proteína. Esta proteína reactiva se usa después directamente para la conjugación con el grupo tiol del GSH reducido.

Ejemplo de referencia 5

Absorción celular específica de GSH y/o transporte transcelular de agentes dirigidos

5 [0055] La absorción celular específica de GSH de los conjugados de GSH se visualiza por análisis de la absorción específica del conjugado de GSH, y se compara con el nivel de absorción de los conjugados de control. Se usan células con una (ausencia de) expresión conocida de transportadores de GSH de varias especies y orígenes, incluyendo células epiteliales renales porcinas (LLC-PK1), células endoteliales capilares cerebrales bovinas (BCEC) y células MDCK caninas. Experimentos de absorción celular: partes alícuotas de 200 nmol de liposomas dirigidos y no dirigidos se añadieron a un modelo *in vitro* de barrera hematoencefálica (cocultivos de astrocitos de rata y células endoteliales capilares bovinas) así como a cultivos únicos de BCEC. Los tiempos de incubación variaron de 10 $\frac{1}{2}$ a 3 h a 37°C. Al final del tratamiento, se fijaron las células en cubreobjetos con PFA al 4% y se lavaron antes de montarse sobre portaobjetos de vidrio con medio de montaje Vectashield con DAPI (contratinción nuclear). El destino de los liposomas en los cultivos celulares se evaluó por microscopía de fluorescencia usando un microscopio invertido NIKON TE2000-E, un filtro de banda triple para rodamina, GFP y DAPI a una magnificación de 15 20x o 60x. La figura 1 muestra la absorción de liposomas dirigidos a GSH por células endoteliales capilares bovinas (BCEC) en un monocultivo de BCEC (placa A) y en el modelo de cocultivo de BHE (placa B). Las micrografías muestran la absorción de liposomas dirigidos a GSH (Rho-PE en rojo) por cultivos de BCEC (núcleos contrateñidos en azul) después de tiempos de incubación de $\frac{1}{2}$ h (A) y 2 h (B). La incubación con liposomas no dirigidos muestra claramente la ausencia de señal roja en o alrededor de las células. 20

Ejemplo de referencia 6

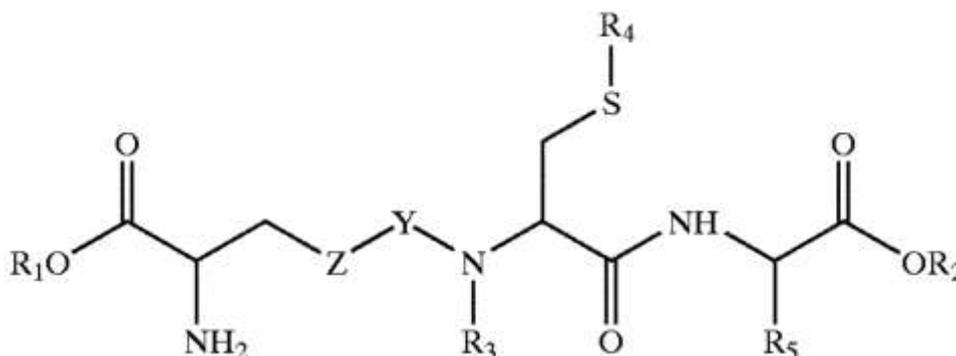
Farmacocinética y biodistribución de agentes dirigidos a GSH

[0056] La farmacocinética y la biodistribución de los liposomas dirigidos a GSH se visualizaron por análisis del marcador Rho-PE en los liposomas después de 12 inyecciones en bolo intravenosas diarias en hámsteres y se compararon con los liposomas no dirigidos. Los liposomas dirigidos a GSH mostraron una acumulación más alta y específica en el cerebro de hámster perfundido, y menor en una selección de otros tejidos analizados (incluidos corazón, pulmón, hígado, bazo y riñón), cuando se compara con los liposomas de control que no eran (o apenas) detectables en tejido cerebral, pero en un grado relativamente mayor en tejido pulmonar, renal y hepático 3 días después de la última inyección. La figura 2 muestra una imagen representativa de un portaobjetos con cerebro de hámster del grupo con la máxima dosis. 25 30

REIVINDICACIONES

1. Conjugado que comprende:

a) un ligando para un transportador de glutatión; donde el ligando se selecciona del grupo que consiste en: glutatión, S-(p-bromobencil)glutatión, gamma-(L-gamma-azaglutamil)-S-(p-bromobencil)-L-cisteinilglicina, S-butilglutatión, S-decilglutatión, éster etílico de glutatión reducido, ácido glutatión sulfónico, S-hexilglutatión, S-lactoilglutatión, S-metilglutatión, S-(4-nitrobenzil)glutatión, S-octilglutatión, S-propilglutatión, n-butanoil gamma-glutamilcisteinilglicina, etanoil gamma-glutamilcisteinilglicina, hexanoil gamma-glutamilcisteinilglicina, octanoil gamma-glutamilcisteinilglicina, dodecanoil gamma-glutamilcisteinilglicina, monoisopropil éster de GSH (N-(N-L-glutamil-L-cisteinil)glicina 1-isopropil éster sulfato monohidratado) y derivados de glutatión con la fórmula I:



donde Z=CH₂ e Y=CH₂, o Z=O e Y = C=O;

R₁ y R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo (1-25C), aralquilo (6-26C), cicloalquilo (6-25C), heterociclos (6-20C), éteres o poliéteres (3-25C) lineales o ramificados, y donde R₁-R₂ juntos tienen de 2 a 20 átomos de carbono y forman un macrociclo con el resto de la fórmula I;

R₃ se selecciona del grupo que consiste en H y CH₃;

R₄ se selecciona del grupo que consiste en alquilo 6-8C, bencilo, naftilo y un compuesto terapéuticamente activo; y,

R₅ se selecciona del grupo que consiste en H, fenilo, CH₃- y CH₂-fenilo; o, una sal de los mismos farmacéuticamente aceptable, y,

b) un liposoma que comprende una antraciclina, donde el ligando de a) se conjuga con el liposoma de b).

2. Conjugado según la reivindicación 1, donde la antraciclina se selecciona del grupo que consiste en aclarrubicina, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, amrubicina, pirarrubicina, valrubicina, zorrubicina.

3. Conjugado según la reivindicación 1 o 2, donde el ligando es un ligando que específicamente se une a o realiza una endocitosis o transcitosis en o a través de una célula diana BCEC o MDCK a una velocidad que está aumentada al menos un 10% en comparación con las condiciones de control seleccionadas de a) células carentes de expresión de transportadores GSH; b) células pretratadas con exceso de GSH libre; y c) un compuesto de referencia carente de una fracción de GSH; medido tras 18 horas o menos después de la adición del ligando a la célula diana.

4. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde en el derivado con la fórmula I, R₃ es H, R₄ es bencilo y R₅ es fenilo.

5. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para usar en el tratamiento o la prevención de un trastorno del sistema nervioso central (SNC).

6. Uso de un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la producción de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno del sistema nervioso central (SNC).

Fig 1

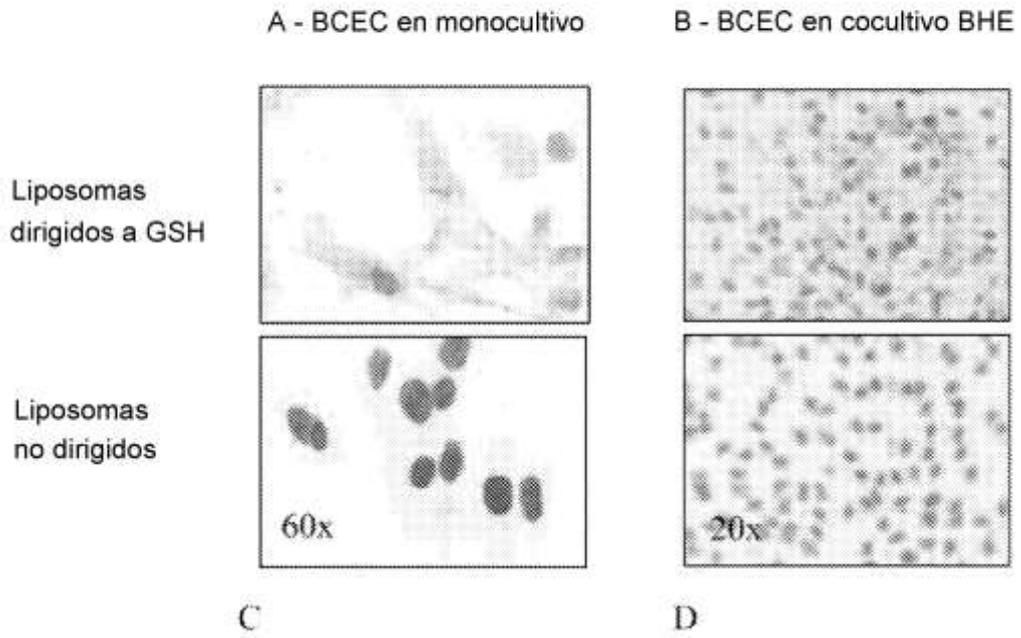


Fig 2

