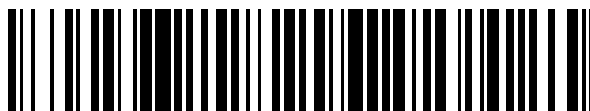


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 225**

51 Int. Cl.:

A61K 47/64 (2007.01)
A61K 38/55 (2006.01)
A61K 31/475 (2006.01)
A61K 31/196 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2006 E 11010125 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 2433653**

54 Título: **Uso de polipéptidos de aprotinina como portadores en conjugados farmacéuticos**

30 Prioridad:

15.07.2005 US 699375 P
13.01.2006 US 758532 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
24.02.2020

73 Titular/es:

ANGIOCHEM INC. (100.0%)
4150 rue Ste. Catherine Ouest, Suite 490
Westmount, QC H3Z 2Y5, CA

72 Inventor/es:

BELIVEAU, RICHARD;
DEMEULE, MICHEL;
CHE, CHRISTIAN y
REGINA, ANTHONY

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 744 225 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

Uso de polipéptidos de aprotinina como portadores en conjugados farmacéuticos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a conjugados portadores de Angiopep-1 y composiciones farmacéuticas y su uso para incrementar la potencia de fármacos y modificar la farmacocinética de compuestos. De manera más particular, la presente invención se refiere a conjugados que comprenden el portador descrito en la presente y su uso en el tratamiento del cáncer.

El alcance de la invención se define por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos o las composiciones farmacéuticas de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o el cuerpo animal por terapia.

15 Antecedentes de la invención

El progreso clínico en el tratamiento de tumores primarios ha sido lento y uno de los problemas asociados con estos tumores es su débil respuesta a los fármacos contra el cáncer. La efectividad de la quimioterapia y la inmunoterapia ha sido afectada por el fenotipo inherente o adquirido de resistencia a fármacos múltiples (MDR, por sus siglas en inglés) de las células cancerosas. Un mecanismo implicado en el fenotipo MDR es ocasionado por la expresión de la P-glicoproteína (P-gp), un transportador de membrana que bombea hacia afuera diversos fármacos anticancerosos de células que expresan MDR1. También se expresa P-gp en un gran número de tejidos secretores normales, tales como riñón, hígado e intestino. Esta bomba de eflujo es expresada fuertemente en capilares del cerebro donde su expresión estuvo localizada principalmente en la membrana luminal de las células endoteliales que recubren los capilares. En seres humanos, P-gp es codificada por dos genes MDR: *MDR1* y *MDR3*. P-gp codificada por el gen *MDR1* humano confiere el fenotipo de resistencia, mientras que P-gp codificada por el gen *MDR3* humano no lo hace. De esta manera, P-gp puede considerarse como un guardián que limita la entrada de fármacos expulsándolos fuera del cerebro o fuera de las células cancerosas, impidiendo que alcancen concentraciones citotóxicas.

Las células cancerosas que forman metástasis del cerebro se originan en su mayoría a partir de cánceres de pulmón o de mama, carcinoma colorrectal, melanoma y tumores de los órganos urinarios. Estas metástasis, que a menudo ocurren después de cirugía, tratamiento de quimioterapia primaria o radioterapia, son quimiorresistentes. La quimioterapia contra metástasis en el cerebro puede ser efectiva únicamente si fuese efectiva para sus tumores originarios correspondientes. Por ejemplo, se demostró que las metástasis en el cerebro originarias de carcinomas de pulmón de células pequeñas y células germinales responden con tasas similares a las metástasis en otros sitios.

La resistencia a fármacos puede ser una propiedad intrínseca de las células tumorales o puede ser adquirida después del tratamiento. La presencia de la bomba de eflujo de P-gp codificada por *MDR1* (también denominada en la presente glicoproteína P, P-gp MDR1 o MDR1) ha sido reportada en la mayoría de los tumores de cerebro primarios donde la mayoría de los gliomas y más particularmente células endoteliales de capilares recién formados fueron teñidos positivos para P-gp MDR1. De esta manera, diversos estudios apoyan la idea de que el fenotipo de resistencia a fármacos múltiples puede ser ocasionado no solamente por la expresión de P-gp en células cancerosas, sino también a partir de su expresión en las células endoteliales recién formadas en los tumores. También se descubrió que los niveles de MDR1 eran significativamente inferiores en metástasis de cerebro a partir de melanomas y de adenocarcinomas de pulmón. Además, se demostró que los tratamientos previos a la cirugía no tienen un impacto importante sobre los niveles de MDR1 en metástasis de cerebro a partir de melanomas, pues eran idénticos en pacientes que recibieron radioterapia, quimioterapia, o ambos tratamientos. En metástasis de pulmón, solamente se detectó MDR1 en pacientes que recibieron quimioterapia, indicando que estos tratamientos previos pueden haber inducido su expresión, dando como resultado un fenotipo MDR adquirido. La falta de expresión de MDR1 en tumores de pulmón primarios y en sus metástasis de cerebro correspondientes indica también que estas metástasis no adquieren los mismos niveles de expresión de P-gp durante su crecimiento que las encontradas en tejido normal del cerebro. Estos resultados también indican que los niveles de MDR1 en células endoteliales de capilares en metástasis de cerebro difieren de los de los tumores de cerebro primarios. La falta de expresión de MDR1 en algunas metástasis de cerebro puede explicar en parte porqué algunas de ellas son más sensibles a los fármacos quimioterapéuticos que los tumores de cerebro primarios.

Los métodos para transportar un compuesto a través de la barrera hematoencefálica han sido descritos en la solicitud de patente internacional PCT/CA2004/000011, publicada el 22 de julio de 2004 bajo la publicación WO 2004 060403.

Brevemente, en este documento, aprotinina, fragmentos y análogos de aprotinina fueron presentados como un sistema de entrega de fármacos para el sistema nervioso central (CNS, por sus siglas en inglés) y para tratar enfermedades relacionadas con el CNS.

Continúa existiendo una necesidad para incrementar la potencia de los fármacos contra el cáncer.

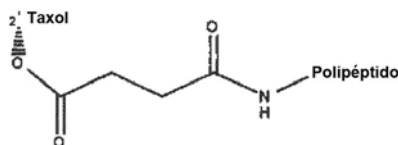
La presente invención busca satisfacer estas y otras necesidades.

Compendio de la invención

5 La presente invención se refiere a un conjugado, o sal farmacéuticamente aceptable de este, que comprende:

- (a) un polipéptido que comprende un análogo biológicamente activo de Angiopep-1, en donde dicho análogo tiene al menos un 80 % de identidad a Angiopep-1 (SEQ ID NO:67), en donde dicho polipéptido es capaz de promover la acumulación de un fármaco dentro de una célula que expresa P-gp en su superficie o una célula que es capaz de expresar P-gp en su superficie; y
- 10 (b) 1, 2 o 3 moléculas de Taxol,

en donde dicho Taxol está conjugado a dicho polipéptido a los restos de lisina en la posición 10 y 15 y/o al N-terminal como se muestra a continuación:



Además, se describe un vehículo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de aprotinina, un fragmento de aprotinina biológicamente activo, Angiopep-1, Angiopep-2 y análogos biológicamente activos, derivados o fragmentos de los mismos. La secuencia de aprotinina así como algunas realizaciones ejemplares de análogos biológicamente activos pueden encontrarse por ejemplo en la solicitud internacional n.º PCT/CA2004/000011.

También se describe un vehículo que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de aprotinina, un fragmento de aprotinina biológicamente activo, Angiopep-1, Angiopep-2 y análogos biológicamente activos, derivados o fragmentos de los mismos.

Tales portadores incluyen aquellos que pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en

- aprotinina (SEQ ID NO: 98),
- un análogo de aprotinina
- un fragmento de aprotinina que puede comprender (o puede consistir esencialmente en) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 1,
- un análogo biológicamente activo de SEQ ID NO: 1,
- un fragmento biológicamente activo de SEQ ID NO: 1 y;
- un fragmento biológicamente activo de un análogo de SEQ ID NO: 1.

Tal portador puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo de:

- un fragmento de aprotinina que puede comprender la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 1,
- un análogo biológicamente activo de SEQ ID NO: 1,
- un fragmento biológicamente activo de SEQ ID NO: 1 y;
- un fragmento biológicamente activo de un análogo de SEQ ID NO: 1.

El fragmento de aprotinina puede consistir en la secuencia definida en SEQ ID NO: 1. El fragmento de aprotinina puede comprender SEQ ID NO: 1 y puede tener una longitud de aproximadamente 19 aminoácidos a aproximadamente 54 aminoácidos, por ejemplo, de 10 a 50 aminoácidos de longitud, de 10 a 30 aminoácidos de longitud etc.

El análogo biológicamente activo de SEQ ID NO: 1, puede tener una longitud de aproximadamente 19 aminoácidos a aproximadamente 54 aminoácidos (por ejemplo, incluyendo por ejemplo 21 a 23, 25 a 34, 36 a 50 y 52 a 54) o de aproximadamente 19 aminoácidos a aproximadamente 50 aminoácidos, o de aproximadamente 19 aminoácidos a aproximadamente 34 aminoácidos (por ejemplo, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34) o de aproximadamente 19 aminoácidos a aproximadamente 23 aminoácidos o de aproximadamente 19, 20, 21, 22, 23, 24, 35, 51 aminoácidos.

Los polipéptidos de la presente invención pueden estar amidados, es decir, pueden tener una secuencia de aminoácidos amidada.

Un fragmento biológicamente activo de un polipéptido (por ejemplo, de 19 aminoácidos) descrito o abarcado en el presente documento puede incluir por ejemplo un polipéptido de aproximadamente 7, 8, 9 o 10 a 18 aminoácidos. Por

lo tanto, un fragmento biológicamente activo de SEQ ID NO: 1 o de un análogo de SEQ ID NO: 1 puede tener una longitud de aproximadamente 7 a aproximadamente 18 aminoácidos o de aproximadamente 10 a aproximadamente 18 aminoácidos.

5 La patente de EE. UU. N.º 5,807,980 describe un polipéptido que es identificado en la presente como la SEQ ID NO.:102.

La patente de EE. UU. N.º 5,780,265 describe un polipéptido que es identificado en la presente como la SEQ ID NO.:103.

10 La secuencia de aminoácidos de aprotinina (SEQ ID NO.:98), la secuencia de aminoácidos de Angiopep-1 (SEQ ID NO.:67), así como algunas secuencias de análogos biológicamente activos pueden encontrarse, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional PCT/CA2004/000011, publicada el 22 de julio de 2004 bajo publicación internacional WO 2004/060403. De manera adicional, la publicación internacional WO 2004/060403 describe un polipéptido que es
15 identificado en la presente como SEQ ID NO.:104.

La patente de EE. UU. N.º 5,118,668 describe polipéptidos que tienen la secuencia ilustrada en la SEQ ID NO.:105.

El portador puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo de;

- 20
- un análogo de SEQ ID NO: 1 que puede comprender al menos un 35 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
 - un análogo de SEQ ID NO: 1 que puede comprender al menos un 40 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
 - 25 - un análogo de SEQ ID NO: 1 que puede comprender al menos un 50 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
 - un análogo de SEQ ID NO: 1 que puede comprender al menos un 60 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
 - un análogo de SEQ ID NO: 1 que puede comprender al menos un 70 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
 - 30 - un análogo de SEQ ID NO: 1 que puede comprender al menos un 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
 - un análogo de SEQ ID NO: 1 que puede comprender al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y;
 - 35 - un análogo de SEQ ID NO: 1 que puede comprender al menos un 95 % (es decir, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % y 100 %) de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,

Por ejemplo, el análogo biológicamente activo de SEQ ID NO: 1 puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos definida en una cualquiera de SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 68 a SEQ ID NO: 93 y SEQ ID NO: 97 así como 99, 100 y 101.

El análogo biológicamente activo de SEQ ID NO: 1 puede comprender la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 67. Esta secuencia puede estar más particularmente amidada.

45 Se describen conjugados que comprenden péptidos SEQ ID NO: 102, 103, 104 y 105.

El fragmento biológicamente activo de SEQ ID NO: 1 o el fragmento biológicamente activo de un análogo de SEQ ID NO: 1 puede comprender al menos 9 o al menos 10 aminoácidos (consecutivos o contiguos) de SEQ ID NO: 1 o del análogo de SEQ ID NO: 1.

50 Los polipéptidos descritos o abarcados en el presente documento pueden tener una secuencia de aminoácidos que puede comprender entre 1 y 12 sustituciones de aminoácidos (es decir, SEQ ID NO: 91). Por ejemplo, la sustitución de aminoácidos puede ser entre 1 y 10 sustituciones de aminoácidos o de 1 a 5 sustituciones de aminoácidos. De acuerdo con la presente invención, la sustitución de aminoácidos puede ser una sustitución de aminoácidos no conservativa o una sustitución de aminoácidos conservativa.

Por ejemplo, cuando un polipéptido comprende aminoácidos que son idénticos a aquellos de SEQ ID NO: 1 y otros aminoácidos que no son idénticos (no idénticos), aquellos que son no idénticos pueden ser una sustitución de aminoácidos conservativa. La comparación de aminoácidos idénticos y no idénticos puede realizarse mirando en la localización correspondiente.

Los ejemplos del análogo de SEQ ID NO: 1 que pueden tener al menos un 35 % de identidad incluyen, por ejemplo, un polipéptido que comprende (que consiste en) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 91 (aproximadamente un 36,8 % de identidad, es decir, 7 aminoácidos de 19 aminoácidos de SEQ ID NO: 91 son idénticos a SEQ ID NO: 1), un polipéptido que comprende (que consiste en) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 98 (aproximadamente un 68,4 % de identidad, es decir, 13 aminoácidos de 19 aminoácidos son idénticos a SEQ

ID NO: 1), un polipéptido que comprende (que consiste en) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 67 (aproximadamente un 73,7 % de identidad, es decir, 14 aminoácidos de 19 aminoácidos son idénticos a SEQ ID NO: 1), un polipéptido que comprende (que consiste en) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 76 (aproximadamente un 73,7 % de identidad, es decir, 14 aminoácidos de 19 aminoácidos son idénticos a SEQ ID NO: 1), y un polipéptido que comprende (que consiste en) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 5 (aproximadamente un 79 % de identidad, es decir, 15 aminoácidos de 19 aminoácidos son idénticos a SEQ ID NO: 1).

Los ejemplos del análogo de SEQ ID NO: 1 que pueden tener al menos un 60 % de identidad incluyen, por ejemplo, un polipéptido que comprende (que consiste en) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 98 (aproximadamente un 68,4 % de identidad, es decir, 13 aminoácidos de 19 aminoácidos son idénticos a SEQ ID NO: 1), un polipéptido que comprende (que consiste en) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 67 (aproximadamente un 73,7 % de identidad, es decir, 14 aminoácidos de 19 aminoácidos son idénticos a SEQ ID NO: 1), un polipéptido que comprende (que consiste en) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 76 (aproximadamente un 73,7 % de identidad, es decir, 14 aminoácidos de 19 aminoácidos son idénticos a SEQ ID NO: 1), y un polipéptido que comprende (que consiste en) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 5 (aproximadamente un 79 % de identidad, es decir, 15 aminoácidos de 19 aminoácidos son idénticos a SEQ ID NO: 1).

Los ejemplos del análogo de SEQ ID NO: 1 que pueden tener al menos un 70 % de identidad incluyen, por ejemplo, un polipéptido que comprende (que consiste en) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 67 (aproximadamente un 73,7 % de identidad, es decir, 14 aminoácidos de 19 aminoácidos son idénticos a SEQ ID NO: 1), un polipéptido que comprende (que consiste en) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 76 (aproximadamente un 73,7 % de identidad, es decir, 14 aminoácidos de 19 aminoácidos son idénticos a SEQ ID NO: 1), y un polipéptido que comprende (que consiste en) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 5 (aproximadamente un 79 % de identidad, es decir, 15 aminoácidos de 19 aminoácidos son idénticos a SEQ ID NO: 1).

De acuerdo con la presente invención, el portador es un polipéptido que comprende un análogo biológicamente activo de Angiopep-1, en donde dicho análogo tiene al menos un 80 % de identidad a Angiopep-1 (SEQ ID NO: 67), en donde dicho polipéptido es capaz de promover la acumulación de un fármaco dentro de una célula que expresa P-gp en su superficie o una célula que es capaz de expresar P-gp en su superficie.

Un portador o la composición farmacéutica descritos o abarcados en el presente documento se usan para modificar y/o mejorar la farmacocinética (*in vivo*) de un compuesto.

De acuerdo con la presente invención, el compuesto es Taxol. Además, el compuesto puede ser seleccionado, por ejemplo, del grupo que consiste en un marcador, una proteína, un péptido y un fármaco de molécula pequeña y la combinación de los mismos.

También de acuerdo con la presente invención, el fármaco de molécula pequeña puede ser, por ejemplo, un fármaco contra el cáncer.

De acuerdo con la presente invención, el fármaco contra el cáncer puede ser conjugado con el portador con ello formando un conjugado. En una realización ejemplar de la invención, el conjugado puede comprender, por ejemplo, al menos una molécula de fármaco contra el cáncer para cada molécula portadora. En otra realización ejemplar de la invención, el conjugado puede comprender, por ejemplo, al menos dos moléculas de fármaco contra el cáncer por cada molécula portadora. En aún otra realización ejemplar de la invención, el conjugado puede comprender, por ejemplo, al menos tres moléculas de fármaco contra el cáncer por cada molécula portadora.

De acuerdo con la presente invención el portador puede promover la acumulación del fármaco en un tejido tal como, por ejemplo, un riñón (tejido de riñón), un hígado (tejido de hígado), un ojo (tejido de ojo), y los pulmones (tejido de pulmón), de un individuo.

También de acuerdo con la presente invención, el portador puede modificar o mejorar la bio-disponibilidad del compuesto.

Además de acuerdo con la presente invención, el portador puede también cambiar la (habitual) distribución en tejido del compuesto.

De acuerdo con la presente invención el portador puede también promover la acumulación del fármaco en el cerebro (tejido de cerebro) de un individuo.

De acuerdo con la presente invención, el cerebro puede ser un cerebro tumoral.

Además de acuerdo con la presente invención, el cerebro puede comprender una célula cancerosa de pulmón.

También de acuerdo con la presente invención, el portador puede promover la acumulación del fármaco en una célula

cancerosa (p. ej., acumulación intracelular del fármaco en la célula cancerosa).

Como se usa en la presente, el término "cerebro tumoral" se refiere a un cerebro que comprende un tumor, ya sea un tumor primario o una metástasis de un origen de tejido diferente, tal como una metástasis que se origina de un tumor de pulmón, un tumor de mama, de un melanoma, de un tumor colorrectal o de un tumor de un órgano urinario. Ejemplos de células de cerebro tumoral de esta manera incluyen, por ejemplo, glioblastomas, y células metastásicas que se originan, por ejemplo, de pulmones, mama, colon, tracto urinario o de melanoma.

De acuerdo con la presente invención, el portador puede de esta manera ser usado, por ejemplo, para reducir la dosis de un fármaco necesaria para lograr el mismo efecto terapéutico (p. ej., para lograr una reducción en el crecimiento de células tumorales).

Se describe además el uso de un portador seleccionado del grupo que consiste en aprotinina, un fragmento de aprotinina biológicamente activo, Angiopep-1, Angiopep-2, análogos biológicamente activos, derivados o fragmentos y combinaciones de los mismos para transportar un compuesto a un sitio objetivo deseado, un tejido objetivo deseado, o una célula objetivo deseada.

Ejemplos de un fármaco de molécula pequeña que puede ser conjugado con el portador de la presente invención y que están abarcados en el presente documento, incluyen, por ejemplo Taxol, un derivado de Taxol, vinblastina, vincristina, etopósido, doxorubicina, ciclofosfamida, Taxotere, melfalán, clorambucil, sales farmacéuticamente aceptables

y sus combinaciones, así como cualquier fármaco que puede ser un sustrato de P-gp, por lo que el Taxol, de acuerdo con la invención, se incluye en el conjugado de la presente invención.

Otro fármaco de molécula pequeña abarcado por la presente invención puede incluir, por ejemplo, un fármaco que tiene un grupo que permite su conjugación al portador de la presente invención.

Realizaciones ejemplares de derivados de Taxol (o análogos) incluyen, por ejemplo, los derivados divulgados y a los que se hace referencia en la patente de EE. UU. N.º 6.911.549, expedida el 28 de junio de 2005.

Ejemplos de marcadores que pueden ser conjugados con el portador de la presente invención y que están abarcados en el presente documento incluyen, por ejemplo un isótopo, un marcador fluorescente (p. ej., rodamina), una molécula indicadora (p. ej., biotina) etc.

Ejemplos de proteínas que pueden ser conjugadas con el portador de la presente invención y que están abarcados en el presente documento incluyen, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un fármaco peptídico o a base de proteína (p. ej., un modulador farmacológico positivo (agonista) o un inhibidor farmacológico (antagonista) etc.

También se describe el uso de un portador seleccionado del grupo que consiste en aprotinina, seleccionado del grupo que consiste en aprotinina, un fragmento de aprotinina biológicamente activo, Angiopep-1, Angiopep-2, análogos biológicamente activos, derivados o fragmentos y combinaciones de los mismos para incrementar la potencia de un fármaco. De manera más particular, el portador puede ser usado para incrementar, por ejemplo, la potencia de un fármaco que puede ser un sustrato de P-gp o fármacos que son expulsados (es decir, arrojados, expelidos de una célula, etc.) por una P-gp o una proteína relacionada con P-gp (p. ej., un variante alélico de P-gp humano o de mamífero, p. ej., una isoforma mdrla y/o mdrlb de un roedor, etc.).

De acuerdo con la presente invención, el portador puede incrementar, por ejemplo, la potencia de un fármaco contra el cáncer, por ejemplo un fármaco contra el cáncer que puede ser un sustrato de P-gp.

Adicionalmente se describe el uso de un portador, el conjugado o la composición farmacéutica descrita en la presente para incrementar (optimizar) un efecto de crecimiento antitumoral de un fármaco contra el cáncer.

Se describe además el uso de un portador seleccionado del grupo que consiste en aprotinina, seleccionado del grupo que consiste en aprotinina, un fragmento de aprotinina biológicamente activo, Angiopep-1, Angiopep-2, análogos biológicamente activos, derivados o fragmentos y combinaciones de los mismos para transportar un fármaco o un marcador en o a un sitio objetivo deseado o para transportar un fármaco o un marcador dentro de una célula objetivo y/o para promover la acumulación de un fármaco o un marcador dentro de una célula, tal como, por ejemplo, una célula que expresa P-gp en su superficie o una célula que es capaz de expresar P-gp (en su superficie).

De acuerdo con la presente invención, el portador puede ser usado, por ejemplo y sin limitación, para promover la acumulación, dentro de una célula, de un fármaco que puede comprender la característica de ser expulsado (es decir, expelido, transportado fuera de una célula, arrojado) por P-gp o una proteína relacionada con P-gp.

De acuerdo con una realización particular de la presente invención, un sitio deseado puede ser, por ejemplo, el cerebro u otros sitios fuera del cerebro (p. ej., un sitio extracraneal) tal como, por ejemplo, los riñones, el hígado, el páncreas, el colon, los ojos, los pulmones, y sus combinaciones. Por tanto, el sitio objetivo deseado puede ser uno o más sitios

seleccionados del grupo que consiste en el cerebro, los riñones, el hígado, el páncreas, el colon, los ojos, los pulmones, y sus combinaciones.

5 De acuerdo con una realización particular de la presente invención, un sitio objetivo deseado puede ser, por ejemplo, una célula o tejido de cerebro.

De acuerdo con otra realización particular de la presente invención, un sitio objetivo deseado puede ser, por ejemplo, una célula o tejido de hígado.

10 De acuerdo con una realización particular adicional de la presente invención, un sitio objetivo deseado puede ser, por ejemplo, una célula o tejido de riñón.

De acuerdo con aún una realización particular adicional de la presente invención, un sitio objetivo deseado puede ser, por ejemplo, una célula o tejido de páncreas.

15 De acuerdo con otra realización particular de la presente invención, un sitio objetivo deseado puede ser, por ejemplo, una célula o tejido de colon.

20 De acuerdo con aún otra realización particular de la presente invención, un sitio objetivo deseado puede ser, por ejemplo, un ojo o célula de ojo.

De acuerdo con una realización particular adicional de la presente invención, un sitio objetivo deseado puede ser, por ejemplo, una célula o tejido de pulmón.

25 Además de acuerdo con la presente invención, el sitio deseado puede ser un sitio que comprende una célula que expresa un receptor o transportador de portador, por ejemplo una célula que expresa un receptor relacionado con lipoproteína de baja densidad (LRP, por sus siglas en inglés). De acuerdo con la invención, la célula es una célula que expresa o es capaz de expresar P-gp o una proteína relacionada con P-gp. La célula, por ejemplo, puede ser una célula normal, una

30 célula de tumor, o una célula metastásica. El portador de la presente invención puede de esta manera ser usado para poner en objetivo una célula de cerebro, una célula de hígado, una célula de riñón, una célula de páncreas, una célula de colon, una célula de ojo, una célula de pulmón, y sus combinaciones (ya sea normales o tumorales).

35 Se describe también el uso de un portador descrito en el presente documento (por ejemplo que puede seleccionarse del grupo que consiste en aprotinina, un fragmento de aprotinina biológicamente activo, Angiopep-1, Angiopep-2, análogos biológicamente activos, derivados o fragmentos y combinaciones de los mismos) o la composición farmacéutica o el conjugado descritos en el presente documento para promover la acumulación intracelular de un compuesto (es decir, promover la acumulación del compuesto dentro de una célula).

40 De acuerdo con la presente invención, el compuesto es Taxol, pero puede ser seleccionado adicionalmente, por ejemplo, del grupo que consiste en un marcador, una proteína, un péptido, y un fármaco de molécula pequeña.

De acuerdo con la presente invención, la célula es una célula que es capaz de expresar P-gp o que exprese P-gp en la superficie celular.

45 La célula, por ejemplo, puede ser una célula de tumor. La célula de tumor puede originarse, por ejemplo, y sin limitación, de un tumor de cerebro, un tumor de pulmón, un tumor de mama, un tumor de riñón, un tumor de ojo, un tumor de hígado, un tumor colorrectal, un tumor de un órgano urinario, etc..

50 De acuerdo con la presente invención la célula puede estar ubicada fuera del cerebro del individuo (mamífero, animal, etc.). Por ejemplo, la célula puede ser una célula de tumor que puede estar ubicada fuera del cerebro de un individuo (mamífero, animal, etc.).

55 De acuerdo con una realización adicional de la presente invención, la célula puede estar ubicada dentro del cerebro de un individuo. La célula, por ejemplo, puede ser una célula tumoral que puede estar ubicada dentro del cerebro de un individuo (mamífero, animal, etc.).

En una realización ejemplar de la presente invención, la célula de tumor puede ser una célula de tumor de cerebro. Por ejemplo, la célula de tumor de cerebro puede originarse de un glioblastoma o puede ser un glioblastoma.

60 En otra realización ejemplar de la presente invención, la célula de tumor puede ser una célula de tumor de pulmón.

65 Se describe también el uso del portador, del conjugado o la composición farmacéutica descritos en la presente, para reducir la eliminación de un fármaco desde el interior de una célula, tal como por ejemplo una célula que puede ser capaz de expresar P-gp (MDR1) o que expresa P-gp. De acuerdo con la presente invención, el fármaco puede ser un sustrato de P-gp.

También de acuerdo con la presente invención, la célula puede ser una célula cancerosa resistente a múltiples fármacos.

5 Se describe adicionalmente el uso de un portador, del conjugado o la composición farmacéutica descritos en la presente, para reducir el crecimiento de una célula. Para ese fin, el portador puede ser conjugado con un fármaco que puede ser capaz de reducir el crecimiento de una célula.

10 De acuerdo con una realización ejemplar de la invención, el portador, el conjugado formado de esta manera o la composición farmacéutica pueden usarse para reducir el crecimiento de una célula de tumor o una célula endotelial.

En una realización ejemplar de la invención, la célula de tumor puede ser una célula de tumor de cerebro. De manera más específica, la célula de tumor de cerebro puede originarse de un glioblastoma o puede ser un glioblastoma.

15 En otra realización ejemplar de la invención, la célula de tumor puede ser una célula de tumor de pulmón.

En aún otra realización ejemplar de la invención, la célula de tumor puede ser una célula de tumor de mama.

20 En una realización ejemplar adicional de la invención, la célula de tumor puede ser una célula de tumor de riñón.

En aún una realización ejemplar adicional de la invención, la célula de tumor puede ser una célula de tumor de ojo.

En una realización adicional de la invención, la célula de tumor puede ser de un cáncer colorrectal.

25 En otra realización adicional de la invención, la célula de tumor puede ser de un tumor de órgano urinario.

De acuerdo con la invención, el fármaco contra el cáncer es Taxol.

30 Un fármaco contra el cáncer adicional puede ser Taxotere o un derivado de Taxol o Taxotere.

Un fármaco contra el cáncer adicional puede ser, por ejemplo, vinblastina.

Un fármaco contra el cáncer adicional puede ser, por ejemplo, vincristina.

35 Un fármaco contra el cáncer adicional puede ser, por ejemplo, etopósido.

Un fármaco contra el cáncer adicional puede ser, por ejemplo, doxorubicina.

40 Un fármaco contra el cáncer adicional puede ser, por ejemplo, ciclofosfamida.

Un fármaco contra el cáncer adicional puede ser, por ejemplo, melfalán.

Un fármaco contra el cáncer adicional puede ser, por ejemplo, clorambucil.

45 Se describe adicionalmente el uso de un portador descrito en la presente en la elaboración de una composición farmacéutica o medicamento para modificar la farmacocinética del fármaco de molécula pequeña.

De manera más particular, el portador puede ser usado para reducir el crecimiento de una célula.

50 También de manera más particular, el portador puede ser usado para promover la acumulación del fármaco de molécula pequeña dentro de una célula.

Además, el portador puede ser usado para reducir la eliminación del fármaco de molécula pequeña desde el interior de una célula.

55 Asimismo, el portador puede ser usado para incrementar un efecto de crecimiento antitumoral del fármaco de molécula pequeña.

Además, el portador puede ser usado para mejorar la biodisponibilidad del fármaco de molécula pequeña.

60 Además y de acuerdo con la presente invención, el portador puede ser usado para cambiar la distribución en tejido (habitual) del fármaco de molécula pequeña.

65 Además, la presente invención se refiere al conjugado de la presente invención para utilizar en un método para el tratamiento del cáncer, cáncer metastásico, y/o metástasis. De acuerdo con la presente invención, una

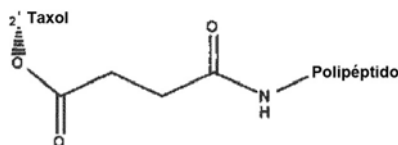
metástasis ejemplar puede comprender una metástasis que puede originarse a partir de un tumor de mama, un tumor de pulmón, un melanoma, etc.

Se describe el uso de un portador seleccionado del grupo que consiste en aprotinina, un fragmento de aprotinina biológicamente activo, Angiopep-1, Angiopep-2, análogos biológicamente activos, derivados o fragmentos y combinaciones de los mismos para la detección de una célula objetivo deseada.

Se describe además el uso de un portador seleccionado del grupo que consiste en aprotinina, un fragmento de aprotinina biológicamente activo, Angiopep-1, Angiopep-2, análogos biológicamente activos, derivados o fragmentos y combinaciones de los mismos para el diagnóstico de un cáncer, un cáncer metastásico, y/o metástasis.

La presente invención se refiere además, en un aspecto adicional, a una composición farmacéutica que comprende el conjugado (y/o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo) de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

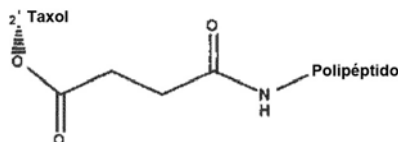
La presente invención, en un aspecto adicional, se refiere a un conjugado y/o una sal farmacéuticamente aceptable de este. El conjugado comprende un portador como se describe en la presente y un compuesto como se describe en el presente documento, por lo que se incluye el Taxol. El portador puede estar unido de manera covalente al compuesto. El Taxol se conjuga al portador a los restos de lisina en la posición 10 y 15 y/o al N-terminal como se muestra a continuación:



De manera más particular, el conjugado o sal farmacéuticamente aceptable de este, comprende:

- (a) un polipéptido que comprende un análogo biológicamente activo de Angiopep-1, en donde dicho análogo tiene al menos un 80 % de identidad a Angiopep-1 (SEQ ID NO:67), en donde dicho polipéptido es capaz de promover la acumulación de un fármaco dentro de una célula que expresa P-gp en su superficie o una célula que es capaz de expresar P-gp en su superficie; y
- (b) 1, 2 o 3 moléculas de Taxol,

en donde dicho Taxol está conjugado a dicho polipéptido a los restos de lisina en la posición 10 y 15 y/o al N-terminal como se muestra a continuación:



También de acuerdo con la presente invención, el compuesto puede ser liberado o no del portador. El compuesto, por tanto, puede ser liberable del conjugado (o del portador).

De acuerdo con la presente invención, el conjugado puede comprender la fórmula R-L-M en donde R es una clase de moléculas relacionadas con la aprotinina siendo un polipéptido que comprende un análogo de Angiopep-1 junto con al menos un 80 % de identidad a Angiopep-1 (SEQ ID NO: 67), L puede ser un enlazador o un enlace y M puede ser un agente o un fármaco seleccionado del grupo que consiste en un fármaco (por ejemplo, un fármaco de molécula pequeña), un marcador, una proteína (por ejemplo, anticuerpo, un fragmento de anticuerpo) y un polipéptido. Ha de entenderse en el presente documento que la fórmula R-L-M no pretende restringirse a un orden específico o una relación específica. Como se está ejemplificando en el presente documento, M puede encontrarse en varias relaciones sobre R.

Se describe el uso de un conjugado que puede comprender a) un portador que puede seleccionarse del grupo que consiste en aprotinina, un fragmento de aprotinina biológicamente activo, Angiopep-1, Angiopep-2, análogos biológicamente activos, derivados o fragmentos y combinaciones de los mismos y b) al menos un fármaco de molécula pequeña o marcador, para modificar la farmacocinética (*in vivo*) del fármaco o marcador que está unido al mismo.

De acuerdo con una realización de la presente invención, el conjugado puede, de manera más particular, usarse para reducir el crecimiento de una célula.

Además de acuerdo con la presente invención, el conjugado puede ser usado para promover la acumulación del

fármaco o marcador dentro de una célula.

También de acuerdo con la presente invención, el conjugado puede también ser usado para reducir la eliminación del fármaco o marcador desde el interior de una célula.

Además de acuerdo con la presente invención, el conjugado puede ser usado para incrementar un efecto de crecimiento antitumoral del fármaco.

También de acuerdo con la presente invención, el conjugado puede mejorar la biodisponibilidad del compuesto.

Además de acuerdo con la presente invención, el conjugado puede también cambiar la distribución en tejido del compuesto.

En una realización de la invención, el fármaco de molécula pequeña puede ser capaz de reducir el crecimiento de una célula.

Se describe también el uso de un conjugado que puede comprender a) un portador que puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en aprotinina, un fragmento de aprotinina biológicamente activo, Angiopep-1, Angiopep-2, análogos biológicamente activos, derivados o fragmentos y combinaciones de los mismos y b) al menos un fármaco de molécula pequeña en la elaboración (elaboración) de una composición farmacéutica o un medicamento para modificar la farmacocinética del fármaco de molécula pequeña.

También se describe el uso del portador en la elaboración de una composición o un medicamento para el tratamiento de una condición tal como cáncer, cáncer metastásico, y/o metástasis.

Se describe también el uso de un conjugado que puede comprender a) un portador que puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en aprotinina, un fragmento de aprotinina biológicamente activo, Angiopep-1, Angiopep-2, análogos biológicamente activos, derivados o fragmentos y combinaciones de los mismos y b) al menos un marcador, para la detección de una célula que puede ser seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en una célula de ojo, una célula de cerebro, una célula de mama, una célula de hígado, una célula de riñón, una célula de órgano urinario, una célula de colon, una célula del recto, y una célula de pulmón.

La célula que puede ser detectada puede ser, por ejemplo, una célula de ojo.

La célula que puede ser detectada puede ser, por ejemplo, una célula de cerebro.

La célula que puede ser detectada puede ser, por ejemplo, una célula de hígado.

La célula que puede ser detectada puede ser, por ejemplo, una célula de mama.

La célula que puede ser detectada puede ser, por ejemplo, una célula de riñón.

La célula que puede ser detectada puede ser, por ejemplo, una célula de pulmón.

La presente invención se refiere adicionalmente a una composición farmacéutica que comprende un conjugado de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica descrita en la presente puede ser usada, por ejemplo, en el tratamiento o la detección de cáncer, cáncer metastásico, y/o metástasis.

Se describe una composición farmacéutica que puede ser capaz, por ejemplo, de reducir el crecimiento de una célula o de la detección de una célula, la composición farmacéutica puede comprender:

- a) un conjugado que puede comprender un portador seleccionado del grupo que consiste en aprotinina, un fragmento de aprotinina biológicamente activo, Angiopep-1, Angiopep-2 y análogos biológicamente activos, derivados o fragmentos de los mismos y un marcador o un fármaco de molécula pequeña capaz de reducir el crecimiento de una célula; y
- b) un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona en un aspecto adicional de la misma, una composición farmacéutica que puede comprender:

- a) un conjugado de la presente invención,
- b) un portador farmacéuticamente aceptable, y
- c) un solubilizador.

De acuerdo con la presente invención, el solubilizador puede ser, por ejemplo, un éster polioxietilénico de ácido graso. Los solubilizadores englobados por la presente invención incluyen, por ejemplo, Solutol® HS-15.

Un solubilizador adecuado puede comprender

5 un éster polioxietilénico de ácido graso, tal como, por ejemplo, Solutol® HS-15.

De acuerdo con una realización de la invención, la composición farmacéutica puede ser usada, de manera más específica, para modificar la farmacocinética de un compuesto, para reducir el crecimiento de una célula de tumor, o para la detección de una célula de tumor, etc.

10 La presente invención se refiere además a al menos un conjugado de la presente invención para utilizar en un método para el tratamiento contra el cáncer, cáncer metastásico y/o metástasis. De acuerdo con la presente invención, una metástasis ejemplar que puede ser tratada usando el conjugado de la presente invención es una metástasis que puede originarse, por ejemplo y sin limitación, a partir de un tumor de mama, un tumor de pulmón, un melanoma etc.

15 El uso en un método para tratar cáncer (tal como, por ejemplo, un tumor primario o un cáncer metastásico y/o metástasis) de acuerdo con la invención o un método para detectar una célula cancerosa puede comprender administrar a un individuo una composición farmacéutica o con un conjugado de la presente invención.

20 De acuerdo con la presente invención, el individuo puede tener, por ejemplo, un tumor extracraneal, un tumor de cerebro primario, o un tumor de cerebro de origen metastásico.

25 El método puede también comprender un paso de determinar si el tumor del individuo comprende una célula de tumor resistente a fármacos múltiples o, por ejemplo, una célula que expresa P-gp (MDR1), o determinar si el tumor puede tener o tiene un fenotipo de resistencia a fármacos múltiples.

30 El individuo puede ser el que tiene un tumor. El individuo también puede ser el que ha recibido o recibirá quimioterapia o radioterapia, o ambas. El individuo puede también ser el que tuvo cirugía. Además, el individuo puede ser el que tiene un tumor de cerebro o puede también ser quien tiene un tumor en otro sitio que no sea el cerebro (está libre de un tumor de cerebro). Un individuo que lo necesita puede también ser, por ejemplo, un individuo que presenta o está en riesgo de presentar una resistencia (fenotipo de resistencia a fármacos múltiples (MDR)) a por lo menos un fármaco.

35 De manera más particular, y de acuerdo con la presente invención, el individuo puede tener, por ejemplo, un tumor extracraneal.

De acuerdo con la presente invención, el tumor extracraneal puede ser, por ejemplo, un tumor de pulmón.

40 También de acuerdo con la presente invención, el tumor extracraneal puede ser, por ejemplo, una metástasis extracraneal de un tumor de cerebro. En una forma de realización más específica de la presente invención, el tumor de cerebro extracraneal puede ser, por ejemplo, un glioblastoma (metástasis extracraneal de glioblastoma).

45 En otra realización particular de la presente invención, el individuo puede tener un tumor de cerebro de origen metastásico. El tumor de cerebro de origen metastásico puede originarse, por ejemplo, de un tumor de pulmón. El tumor de cerebro de origen metastásico puede también originarse, por ejemplo, de un tumor de mama. Adicionalmente, el tumor de cerebro de origen metastásico puede también originarse, por ejemplo, a partir de un melanoma. Además, y como se describe en la presente, el tumor de cerebro de origen metastásico puede también originarse, por ejemplo, de un cáncer colorrectal. Además, el tumor de cerebro de origen metastásico puede también originarse, por ejemplo, de un tumor de un órgano urinario.

50 De acuerdo con la presente invención, el tumor comprende una célula de tumor que es capaz de expresar P-gp o que expresa P-gp. en la superficie.

55 De acuerdo con la presente invención, el tumor puede comprender una célula de tumor que puede ser capaz de expresar LRP o que expresa LRP.

De acuerdo con la presente invención, la célula de tumor puede comprender una célula de tumor que puede ser capaz de co-expresar P-gp y LRP o que co-expresa P-gp y LRP. Pueden ubicarse P-gp y LRP, por ejemplo, en una superficie celular.

60 Se describe un método para promover la acumulación de un fármaco en el cerebro de un individuo que tiene una metástasis. El método puede comprender administrar un portador o conjugado, como se describe en la presente, a un individuo que tiene una metástasis de cerebro. La metástasis puede originarse de un cáncer de pulmón, etc.

65 Se describe un método para promover la acumulación intracelular de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un marcador, una proteína, un péptido, y un fármaco de molécula pequeña.

El método puede comprender el paso de poner en contacto la célula o proveer la célula con un conjugado que puede comprender a) un portador que puede seleccionarse del grupo que consiste en aprotinina, un fragmento de aprotinina biológicamente activo, Angiopep-1, Angiopep-2 y análogos biológicamente activos, derivados o fragmentos de los mismos y b) el compuesto deseado.

De acuerdo con la presente invención, la célula es una célula que expresa P-gp en su superficie.

Además de acuerdo con la presente invención, la célula, por ejemplo, puede ser una célula de cerebro, una célula de pulmón, una célula de mama, una célula de riñón, una célula de ojo o una célula de hígado.

También de acuerdo con la presente invención, la célula, por ejemplo, puede ser una célula de tumor que puede estar localizada fuera de un cerebro de un individuo (mamífero, animal, etc.).

También se describe un método para reducir la eliminación de un fármaco desde el interior de una célula que es capaz de expresar o que expresa P-gp (MDR1).

El método puede comprender conjugar el fármaco con un portador descrito en la presente, con ello formando un conjugado y proveyendo la célula con el conjugado.

La célula puede ser una célula cancerosa resistente a fármacos múltiples.

La célula puede estar comprendida dentro de un tumor extracraneal de un individuo.

La célula puede estar comprendida dentro del cerebro de un individuo. La célula puede ser una célula de tumor, tal como, por ejemplo, una célula de tumor de cerebro (primario) o una célula de tumor de cerebro metastásico.

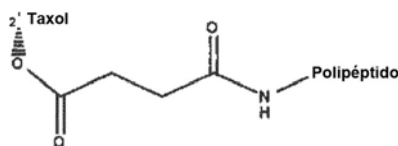
Los medios para proveer una célula con un conjugado, por ejemplo, son para proveer el conjugado a un individuo que comprende una célula resistente a fármacos múltiples o una célula de tumor resistente a fármacos múltiples (p. ej., o una célula que expresa MDR1).

El método puede ser usado para reducir la eliminación de un fármaco que es un sustrato de P-gp o que puede ser un sustrato de P-gp.

Se describe adicionalmente un método para reducir el crecimiento de una célula. El método puede comprender poner en contacto la célula con un conjugado que puede comprender a) un portador que puede seleccionarse del grupo que consiste en aprotinina, un fragmento de aprotinina biológicamente activo, Angiopep-1, Angiopep-2 y análogos biológicamente activos, derivados y b) un fármaco capaz de reducir el crecimiento de una célula, o con la composición farmacéutica descrita en la presente.

De acuerdo con la presente invención el portador de Angiopep-2 puede ser usado para incrementar la potencia (eficiencia, efectividad) del fármaco de molécula pequeña.

La conjugación del fármaco de molécula pequeña con el portador puede ser lograda mediante diversos medios que pueden incluir utilizar un conector (p. ej., un conector capaz de generar un enlace éster), que puede permitir la asociación del fármaco mediante un átomo adecuado, por ejemplo mediante un átomo de oxígeno. De acuerdo con la presente invención, el Taxol se conjuga al polipéptido que comprende un análogo de Angiopep-1 que tiene al menos un 80 % de identidad a Angiopep-1 (SEQ ID NO:67) a los restos de lisina en la posición 10 y 15 y/o al N-terminal como se muestra a continuación:



La presente invención describe un método para modificar la farmacocinética de un compuesto que puede ser seleccionado, por ejemplo, del grupo que consiste en un marcador, una proteína, un péptido, y un fármaco de molécula pequeña, el método pudiendo comprender el paso de conjugar el compuesto con un portador descrito en la presente, con ello formando un conjugado y proveyendo el conjugado a un individuo que lo necesita.

Puede usarse una relación de una molécula del compuesto por cada molécula portadora para el paso de conjugación.

Puede usarse una relación de al menos dos moléculas del compuesto por cada molécula portadora para el paso de conjugación.

Puede usarse una relación de al menos tres moléculas del compuesto por cada molécula portadora para el paso de conjugación.

5 El compuesto, por ejemplo, puede ser un fármaco de molécula pequeña.

El compuesto puede ser, por ejemplo, un marcador.

10 De acuerdo con la presente invención, el individuo que lo necesita puede ser, de manera más particular, un individuo que tiene un tumor. Por ejemplo, el individuo puede tener un tumor de cerebro. De acuerdo con la presente invención, el tumor de cerebro puede ser, por ejemplo, un tumor de cerebro primario. También de acuerdo con la presente invención, el tumor de cerebro puede ser, por ejemplo, de un origen de tejido diferente al tejido de cerebro.

15 En una realización ejemplar de la invención, el tumor de cerebro del individuo puede ser, por ejemplo, un tumor de cerebro extracraneal.

De acuerdo con la presente invención el tumor puede comprender una célula de tumor que expresa o que es capaz de expresar P-gp (MDR1).

20 El tumor de cerebro puede originarse, por ejemplo, a partir de un tumor de pulmón. El tumor de cerebro puede también originarse, por ejemplo, a partir de un tumor de mama. Asimismo, por ejemplo, el tumor de cerebro puede originarse de un melanoma.

25 El método puede aumentar (optimizar), por ejemplo, un efecto anti-crecimiento de tumor de un fármaco anticáncer (en comparación con fármaco sin conjugar).

El método puede promover, por ejemplo, la acumulación del compuesto dentro de una célula (es decir, en el interior de una célula).

30 El método puede permitir una reducción en la eliminación del fármaco de molécula pequeña desde el interior de una célula (por ejemplo, una célula que expresa P-gp).

El método puede permitir una reducción del crecimiento celular (por ejemplo, la reducción del crecimiento celular del tumor).

35 Adicionalmente, el método puede permitir una mejora en la biodisponibilidad del fármaco de molécula pequeña.

Además, el método puede usarse para cambiar la distribución tisular (habitual) del fármaco de molécula pequeña.

40 En aún un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un portador, conjugado, o la composición farmacéutica de la presente invención para reducir la acumulación de LRP dependiente de RAP y para reducir el evento o efecto (p. ej., intracelular) mediado por RAP.

Para los fines de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

45 El término "Angiopep", como se usa en la presente, se refiere a Angiopep-1 y Angiopep-2.

Los términos "Taxol-Angiopep" y "TxIA_n" son usados de manera intercambiable y se refieren a Taxol-Angiopep-1 y Taxol-Angiopep-2, comprendiendo una, dos o tres moléculas de Taxol.

50 Los términos "Taxol-Angiopep-1" y "TxIA_n1" son usados de manera intercambiable y se refieren a Taxol-Angiopep-1, comprendiendo ya sea una, dos o tres moléculas de Taxol.

55 Los términos "Taxol-Angiopep-2" y "TxIA_n2" son usados de manera intercambiable y se refieren a Taxol-Angiopep-2, comprendiendo ya sea una, dos o tres moléculas de Taxol.

60 El término "TxIA_n1 (2:1)" se refiere a la relación de moléculas de Taxol con Angiopep-1 en un conjugado dado. Por ejemplo, el término "TxIA_n1 (2:1)" se refiere a un conjugado que tiene dos moléculas de Taxol asociadas con una molécula de Angiopep-1. Además, el término "TxIA_n1 (3:1)" se refiere a un conjugado que tiene tres moléculas de Taxol asociadas con una molécula de Angiopep-1.

65 De manera similar, el término "TxIA_n2 (2:1)" se refiere a la relación de moléculas de Taxol con Angiopep-2 en un conjugado dado. Por ejemplo, el término "TxIA_n2 (2:1)" se refiere a un conjugado que tiene dos moléculas de Taxol asociadas con una molécula de Angiopep-2. Además, el término "TxIA_n2 (3:1)" se refiere a un conjugado que tiene tres moléculas de Taxol asociadas con una molécula de Angiopep-2.

El término "portador" o "vector" significa un compuesto o molécula que es capaz de transportar una molécula a un sitio o célula objetivo deseado. Un portador puede estar unido (de manera covalente o no) o conjugado con otro compuesto o agente y con ello puede ser capaz de transportar el otro compuesto o agente a un sitio objetivo deseado. El portador puede ser una proteína, un péptido o un peptidomimético y puede ser de origen natural o producido mediante síntesis química o tecnología genética recombinante (ingeniería genética).

La expresión "fármaco de molécula pequeña" significa un fármaco que tiene un peso molecular de 1,000 g/mol o menos o entre 300 y 700 g/mol.

Los términos "tratamiento", "tratar" y similares significan obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado, p. ej., inhibir el crecimiento de células cancerosas, muerte de una célula cancerosa o mejora de una condición o enfermedad neurológica. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de esta y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", como se usa en la presente, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) prevenir la ocurrencia de una enfermedad (p. ej., prevenir el cáncer) o una condición en un individuo que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que todavía no ha sido diagnosticado por tenerla; (b) inhibir una enfermedad (p. ej., detener su desarrollo); o (c) aliviar una enfermedad (p. ej., reducir los síntomas asociados con una enfermedad). "Tratamiento", como se usa en la presente, cubre cualquier administración de un agente farmacéutico o compuesto a un individuo para tratar, curar, aliviar, mejorar, disminuir o inhibir una condición en el individuo, incluyendo administrar un fármaco que comprende un portador descrito en la presente o un conjugado a un individuo que lo necesita.

El término "cáncer" significa cualquier malignidad celular cuyo único rasgo sea la pérdida de los controles normales, lo que da como resultado crecimiento no regulado, falta de diferenciación y capacidad de invadir tejidos locales y crear metástasis. El cáncer puede desarrollarse en cualquier tejido de cualquier órgano. De manera más específica, se pretende que el término "cáncer" incluya cáncer de cerebro.

Los términos "administrar" y "administración" significan un modo de administración incluyendo, sin limitación, vía intraarterial, intranasal, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica o *per os*. Una dosificación diaria puede dividirse en una, dos o más dosis en una forma adecuada para administrarse una, dos o más veces en un periodo de tiempo.

Los términos "terapéuticamente efectiva" o "cantidad efectiva" significan una cantidad de un compuesto suficiente para mejorar sustancialmente algún síntoma asociado con una enfermedad o una condición médica. Por ejemplo, en el tratamiento del cáncer, sería terapéuticamente efectivo un agente o compuesto que reduce, previene, retrasa, suprime o detiene cualquier síntoma de la enfermedad o condición. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente o compuesto no es requerida para curar una enfermedad o condición, pero proveerá un tratamiento para una enfermedad o condición tal que se retrase, impida o prevenga, o se alivie la enfermedad o condición, o se cambie el término de la enfermedad o condición, o por ejemplo sea menos severa o se acelere la recuperación en un individuo.

El conjugado de la presente invención puede ser usado en combinación con ya sea métodos convencionales de tratamiento y/o terapia o por separado de los métodos convencionales de tratamiento y/o terapia.

Cuando los conjugados de esta invención son administrados en terapias de combinación con otros agentes, pueden administrarse de manera secuencial o simultánea a un individuo. De manera alternativa, composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden comprender una combinación de un conjugado portador-agente de la presente invención en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable o excipiente farmacéuticamente aceptable, como se describe en la presente, y otro agente terapéutico o profiláctico conocido en la materia.

Pueden prepararse sales de ácido (de adición) farmacéuticamente aceptables por los métodos conocidos y usados en la materia.

Como se usa en la presente, "composición farmacéutica" significa cantidades terapéuticamente efectivas del agente junto con diluyentes, conservadores, solubilizadores, emulsificantes, adyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables. Una "cantidad terapéuticamente efectiva", como se usa en la presente, se refiere a esa cantidad que provee un efecto terapéutico para una condición y un régimen de administración dados. Tales composiciones son formulaciones líquidas o liofilizadas o secas de otra manera e incluyen diluyentes de diverso contenido de amortiguadores de pH (p. ej., Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y concentración iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para prevenir absorción en superficies, detergentes (p. ej., Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácido de bilis). Los agentes solubilizadores (p. ej., glicerol, polietilén glicerol), antioxidantes (p. ej., ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservadores (p. ej., timerosal, alcohol bencílico, parabenos), sustancias engrosadoras o modificadores de tonicidad (p. ej., lactosa, manitol), unión covalente de polímeros, tales como polietilén glicol a la proteína, formación de complejos con iones de metales, o incorporación de material en o sobre preparaciones en partículas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc., o en liposomas, microemulsiones, micelios, vesículas unilamelares o multilamelares, eritrocitos acrómicos, o esferoplastos. Tales composiciones influenciarán el estado físico, la solubilidad, la estabilidad, la tasa de liberación *in vivo*, y la tasa de

eliminación *in vivo*. Composiciones de liberación controlada o sostenida incluye formulación en depósitos lipófilos (p. ej., ácidos grasos, parafinas, aceites). También están comprendidas en la invención las composiciones en partículas revestidas con polímeros (p. ej., poloxámeros o poloxaminas). Otras realizaciones de las composiciones de la invención incorporan revestimientos protectores de formas en partículas, inhibidores de proteasa o mejoradores de permeación para diversas rutas de administración, incluyendo parenteral, pulmonar, nasal, oral, vaginal, rectal. En una realización la composición farmacéutica se administra por vía parenteral, paracanceral, transmucosal, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal e intratumoral.

Además, como se usan en la presente, los términos "portador farmacéuticamente aceptable" o "portador farmacéutico" son conocidos en la materia e incluyen pero no se limitan a, amortiguador de fosfato 0,01-0,1 M o 0,05 M o solución salina al 0,8%. De manera adicional, tales portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser un amortiguador, soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones, y emulsiones. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios amortiguados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, aceites de Ringer lactados o aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen rellenos de fluidos y nutrientes, rellenos de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. También pueden estar presentes conservadores y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes de cotejo, gases inertes y similares.

Debe entenderse en la presente como un "fragmento" a un polipéptido que se origina de (engloba) una porción de una secuencia original o parental. Los fragmentos engloban polipéptidos que tienen cortes de uno o más aminoácidos, donde el corte se puede originar del término amino (término N), el término carboxi (término C), o del interior de una proteína. Un fragmento puede comprender la misma secuencia que la porción correspondiente de la secuencia original. Los fragmentos biológicamente activos del portador descrito en el presente documento están abarcados por la presente invención.

Un "derivado", en el contexto de proteínas o péptidos, debe entenderse en la presente como un polipéptido que se origina de una secuencia original o de una porción de una secuencia original y que puede comprender una o más modificaciones; por ejemplo, una o más modificaciones en la secuencia de aminoácidos (p. ej., una adición, eliminación, inserción, sustitución, etc., de un aminoácido) y una o más modificaciones en la columna vertebral o la cadena lateral de uno o más aminoácidos, o una adición de un grupo u otra molécula a uno o más aminoácidos (cadenas laterales o columna vertebral). Los fragmentos biológicamente activos del portador descrito en el presente documento están abarcados por la presente invención.

Un "análogo" en el contexto de proteínas o péptido debe entenderse en la presente como una molécula que tienen una actividad biológica y una estructura química similares a las de un polipéptido descrito en la presente. Un análogo comprende un polipéptido que puede tener, por ejemplo, una o más inserciones de aminoácidos, ya sea en uno o ambos extremos del polipéptido y/o dentro de la secuencia de aminoácidos del polipéptido.

Un "análogo" puede tener similitud de secuencia con una secuencia original o una porción de una secuencia original y puede también tener una modificación de su estructura como se discute en el presente documento. Por ejemplo, un "análogo" puede tener al menos 90% de similitud de secuencia con una secuencia original o una porción de una secuencia original. Un "análogo" puede también tener, por ejemplo, al menos 70 o incluso 50% de similitud de secuencia con una secuencia original o una porción de una secuencia original.

Un "análogo" puede tener, por ejemplo, 50, 70, 80 o 90% de similitud de secuencia con una secuencia original con una combinación de una o más modificaciones en una columna vertebral o cadena lateral de un aminoácido, o una adición de un grupo u otra molécula, etc. Los aminoácidos que están destinados a ser similares (un aminoácido conservador) a otro son conocidos en la materia e incluyen, por ejemplo, los enumerados en la Tabla 1.

Además, un "análogo" puede tener al menos 50, 70, 80 o 90% de identidad de secuencia con una secuencia original o una porción de una secuencia original. Asimismo, un "análogo" puede tener, por ejemplo, 50, 70, 80 o 90% de identidad de secuencia con una secuencia original con una combinación de una o más modificaciones en una columna vertebral o cadena lateral de un aminoácido, o una adición de un grupo u otra molécula, etc.

La similitud o la identidad pueden compararse, por ejemplo, en una región de 2, 3, 4, 5, 10, 19, 20 aminoácidos o más (y cualquier número entre éstos). La identidad puede incluir en la presente aminoácidos que son idénticos al péptido original y que pueden ocupar la misma o similar posición cuando se comparan con el polipéptido original. Un análogo que tiene, por ejemplo, 50% de identidad con un polipéptido original puede incluir, por ejemplo, un análogo que comprende 50% del aminoácido del polipéptido original y similarmente con otros porcentajes. Se entenderá en la presente que pueden encontrarse espacios entre los aminoácidos de análogos que son idénticos o similares a los aminoácidos del péptido original. Los espacios pueden no incluir aminoácidos, o incluir uno o más aminoácidos que no son idénticos o similares al péptido original. Los fragmentos biológicamente activos del portador descrito en el presente documento están abarcados por la presente invención.

De esta manera, se describen los polipéptidos biológicamente activos en forma de los polipéptidos originales, fragmentos (modificados o no), análogos (modificados o no), derivados (modificados o no), homólogos (modificados o

no) del portador.

Por lo tanto, cualquier polipéptido que tenga una modificación en comparación con un polipéptido original que no destruye significativamente una actividad biológica deseada se describe en el presente documento. Es bien conocido en la técnica, que puede realizarse varias modificaciones a los polipéptidos de la presente invención sin afectar perjudicialmente su actividad biológica. Estas modificaciones pueden, por otro lado, mantener o aumentar la actividad biológica del polipéptido original o pueden optimizar uno o más de la particularidad (por ejemplo, estabilidad, biodisponibilidad, etc.) de los polipéptidos de la presente invención que, en algún caso pueden necesitarse o ser deseables. Los polipéptidos de la presente invención comprenden por ejemplo, aquellos que contienen secuencias de aminoácidos modificadas bien por procesos naturales, tales como procesamiento post-traducciona, o bien por técnicas de modificación química que se conocen en la técnica. Las modificaciones pueden producirse en cualquier lugar en un polipéptido incluyendo la estructura polipeptídica, las cadenas laterales de aminoácidos y el extremo amino o carboxi. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o variables en varios sitios en un polipéptido dado. También, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden estar ramificados como un resultado de ubicuitinación y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procesos naturales post-traduccionales o pueden fabricarse por métodos sintéticos. Las modificaciones comprenden por ejemplo, sin limitación, pegilación, acetilación, acilación, adición de grupo acetomidometilo (Acm), ADP-ribosilación, alquilación, amidación, biotilación, carbamoylación, carboxietilación, esterificación, unión covalente a flavina, unión covalente a resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de fármaco, unión covalente de un marcador (por ejemplo, fluorescente, radiactivo, etc.), unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlace disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de anclaje de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tales como arginilación y ubicuitinación, etc. Ha de entenderse en el presente documento que más de una modificación a los polipéptidos comprendidos por los conjugados de la presente invención están abarcados por la presente invención en el grado en que la actividad biológica sea similar al polipéptido original (parental).

Como se discutió antes, la modificación de polipéptidos puede comprender, por ejemplo, inserción (es decir, adición), eliminación y sustitución (es decir, reemplazo) de aminoácidos, ya sea conservadoras o no conservadoras (p. ej., D-aminoácidos, ácidos desamino) en la secuencia del polipéptido donde tales cambios no alteran sustancialmente la actividad biológica global del polipéptido.

Ejemplos de sustituciones pueden ser aquellas que son conservadoras (es decir, donde un residuo es reemplazado por otro del mismo tipo o grupo general), o cuando se desea, no conservadoras (es decir, donde un residuo es reemplazado por un aminoácido de otro tipo). Además, un aminoácido que no ocurre de manera natural puede sustituirse por un aminoácido que ocurre de manera natural (es decir, sustitución conservadora de aminoácido que no ocurre de manera natural o sustitución de aminoácido no conservadora que no ocurre de manera natural).

Como se entiende, los aminoácidos que ocurren de manera natural pueden subclasificarse como ácidos, básicos, neutros y polares, o neutros y no polares. Además, tres de los aminoácidos codificados son aromáticos. Puede ser útil que los polipéptidos codificados que difieren del polipéptido determinado de la presente invención contengan codones sustituidos por aminoácidos, que sean del mismo tipo o grupo que el aminoácido por reemplazarse. De esta manera, en algunos casos, los aminoácidos básicos Lys, Arg y His pueden ser intercambiables; los aminoácidos ácidos Asp y Glu pueden ser intercambiables; los aminoácidos neutros polares Ser, Thr, Cys, Gln y Asn pueden ser intercambiables; los aminoácidos alifáticos no polares Gly, Ala, Val, Ile y Leu son intercambiables pero debido al tamaño, Gly y Ala están más estrechamente relacionados, y Val, Ile y Leu están más estrechamente relacionados entre sí, y los aminoácidos aromáticos Phe, Trp y Tyr pueden ser intercambiables.

Debe observarse además que si los polipéptidos son hechos de manera sintética, pueden también hacerse sustituciones por aminoácidos que no son codificados de manera natural por medio de ADN (aminoácido que no ocurre de manera natural o no natural).

Debe entenderse a un aminoácido que no ocurre de manera natural en la presente como un aminoácido que no se produce o se encuentra de manera natural en un mamífero. Un aminoácido que no ocurre naturalmente comprende un D-aminoácido, un aminoácido que tiene un grupo acetilaminometil unido a un átomo de azufre de una cisteína, un aminoácido pegilado, etc. La inclusión de un aminoácido que no ocurre de manera natural en una secuencia definida de polipéptido por tanto generará un derivado del polipéptido original. Aminoácidos (residuos) que ocurren de manera natural incluyen también los aminoácidos omega de la fórmula $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, donde n es 2-6 aminoácidos no polares neutros, tales como sarcosina, t-butil alanina, t-butil glicina, N-metil isoleucina, norleucina, etc. Puede sustituirse fenilglicina por Trp, Tyr o Phe; citrulina y sulfóxido de metionina son no polares, neutros, el ácido cisteico es ácido, y ornitina es básico. La prolina puede ser sustituida con hidroxiprolina y conservar las propiedades que confieren la conformación.

Se conoce en la materia que pueden generarse análogos mediante mutagénesis por sustitución y conservan la actividad biológica de los polipéptidos de la presente invención. Estos análogos tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de proteína removida y un residuo diferente insertado en su lugar. Ejemplos de sustituciones identificadas como "sustituciones conservadoras" son mostrados en la Tabla 1. Si tales sustituciones dan como resultado un cambio no deseado, entonces se introduce otro tipo de sustituciones, denominadas "sustituciones ejemplares" en la Tabla 1, o como se describe en la presente adicionalmente con referencia a clases de aminoácidos, y los productos son analizados y seleccionados.

En algunos casos, puede ser de interés modificar la actividad biológica de un polipéptido mediante sustitución, inserción o eliminación de aminoácidos. Por ejemplo, la modificación de un polipéptido puede dar como resultado un incremento en la actividad biológica del polipéptido, puede modular su toxicidad, puede dar como resultado cambios en la biodisponibilidad o en la estabilidad, o puede modular su actividad inmunológica o su identidad inmunológica. Modificaciones sustanciales en la función o la identidad inmunológica son logradas seleccionando sustituciones que difieren de manera significativa en su efecto en cuanto a mantener (a) la estructura de la columna vertebral del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hoja o helicoidal, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos que ocurren de manera natural son divididos en grupos con base en propiedades comunes de la cadena lateral:

(1) hidrófobos: norleucina, metionina (Met), Alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile);

(2) hidrófilos neutros: cisteína (Cys), serina (Ser), treonina (Thr);

(3) ácidos: ácido aspártico (asp), ácido glutámico (Glu);

(4) básicos: asparagina (Asn), glutamina (Gln), histidina (His), lisina (Lys), arginina (Arg);

(5) residuos que influyen la orientación de cadena: glicina (Gly), prolina (Pro); y aromáticos: triptofano (Trp), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe).

Las sustituciones no conservadoras implican intercambiar un miembro de estas clases por otro.

Tabla 1. Sustitución de aminoácidos

Residuo Original	Sustitución Ejemplar	Sustitución Conservadora
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, norleucina	Leu

Un análogo biológicamente activo puede ser, por ejemplo, un análogo que tiene al menos una sustitución de aminoácido conservativa en la secuencia original. Un análogo biológicamente activo puede ser también por ejemplo,

un análogo que tenga una inserción de un aminoácido.

Por ejemplo, un análogo de Angiopep-1 puede tener la fórmula I: X₁-Angiopep-1-X₂

Por ejemplo, un análogo de Angiopep-2 puede tener la fórmula II: X₁-Angiopep-2-X₂

X₁ y X₂ pueden ser, de manera independiente, una secuencia de aminoácidos de entre 0 y alrededor de 100 aminoácidos (p. ej., de entre 0 y alrededor de 60 aminoácidos). X₁ y X₂ pueden ser derivados de aminoácidos consecutivos de aprotinina o análogos de aprotinina (secuencia homóloga de aminoácidos) o pueden ser cualquiera otra secuencia de aminoácidos (secuencia heteróloga de aminoácidos). Un compuesto de fórmula I o bien II, puede comprender también una sustitución, delección o inserción de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos de Angiopep-1 o Angiopep-2. El análogo, sin embargo, de preferencia sería biológicamente activo, como se determina por medio de uno de los ensayos descritos en la presente o por cualquier ensayo similar o equivalente.

Se pueden encontrar ejemplos de análogos de aprotinina llevando a cabo un blast proteico (Genebank: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) de la secuencia de aprotinina sintética (o porción de esta) descrita en la solicitud de patente internacional n.º PCT/CA2004/000011. Se pueden encontrar análogos de aprotinina ejemplares, por ejemplo, con los n.ºs de acceso CAA37967 (GI: 58005), 1405218C (GI:3604747) etc.

Un fragmento biológicamente activo de un polipéptido (por ejemplo, de 19 aminoácidos) descrito en el presente documento puede incluir por ejemplo un polipéptido de aproximadamente 7, 8, 9 o 10 a 18 aminoácidos.

Un polipéptido biológicamente activo (p. ej., portador) puede ser identificado usando uno de los ensayos o métodos descritos en la presente. Por ejemplo, un portador candidato puede ser producido por medio de síntesis convencional de péptidos, conjugado con Taxol como se describe en la presente, y probado en un modelo *in vivo*, como se describe en el Ejemplo 5. Un portador biológicamente activo puede ser identificado, por ejemplo, con base en su eficacia para reducir una carga tumoral en comparación con ratones tratados con placebo. Un fármaco de molécula pequeña candidato que puede ser usado en la conjugación de un portador descrito en la presente puede ser identificado, por ejemplo, determinando o no si el fármaco es expulsado de células que sobreexpresan P-gp, como se describe en la presente, y evaluando si su conjugación con el portador incrementa su acumulación dentro de una célula deseada.

Ejemplos de portador biológicamente activo (es decir, análogo biológicamente activo de Angiopep-1 y/o Angiopep-2) pueden incluir por ejemplo, péptidos derivados del dominio kunitz tales como TFFYGGCRGKRNNFKTKEY, RFKYGGCLGNKNNYLRLKY y TFFYGGCRAKRNNFKRAKY.

Otros ejemplos de análogos biológicamente activos pueden encontrarse en la Tabla 2 y en el listado de secuencias.

Tabla 2: Diseño de 96 péptidos a partir de un dominio similar a aprotinina y Angiopep-1 con inserciones aminoácidas y cargas diferentes

		96 PÉPTIDOS ENCARGADOS A SYNPEP (California, EE.UU.)																					
Características de proteínas		n.º Pep 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22																					
Aprot-sint		1	T	F	V	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	S	A	E	D		
Bikunina HI-30		2	T	F	Q	Y	G	G	C	M	G	N	G	N	N	F	V	T	E	K	E		
Amiloide		3	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	N	R	N	N	F	D	T	E	E	Y		
Kunitz-Inhib 1		4	S	F	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	Y	L	R	E	E	E			
Péptidos	CARGA (+6)	5	T	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y		
		6	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y		
		7	T	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	K	N	N	Y	K	R	A	K	Y		
		8	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	K	R	A	K	Y		
		9	T	F	Q	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y		
		10	T	F	Q	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	K	R	A	K	Y		
		11	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y		
	CARGA(+5)	12	T	F	F	Y	G	G	S	L	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y		
		13	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	K	K	N	N	F	K	R	A	K	Y		
		14	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	G	N	N	Y	K	R	A	K	Y		
		15	P	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	L	R	A	K	Y		
		16	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	R	E	K	Y		
		17	P	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	K	N	N	F	K	R	A	K	E		
		18	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	D		
		19	T	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	D	R	A	K	Y		
	CARGA(+4)	20	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	K	R	A	E	Y		
		21	P	F	F	Y	G	G	C	G	A	N	R	N	N	F	K	R	A	K	Y		
		22	T	F	F	Y	G	G	C	G	G	K	K	N	N	F	K	T	A	K	Y		

(continuación)	
<u>96 PÉPTIDOS ENCARGADOS A SYNPEP (California, EE.UU.)</u>	
Características de proteínas	n.º Pep 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
	23 T F F Y G G C R G N R N N F L R A K Y
	24 T F F Y G G C R G N R N N F K T A K Y
	25 T F F Y G G S R G N R N N F K T A K Y
CARGA(+3)	26 T F F Y G G C L G N G N N F K R A K Y
	27 T F F Y G G C L G N R N N F L R A K Y
	28 T F F Y G G C L G N R N N F K T A K Y
	29 T F F Y G G C R G N G N N F K S A K Y
	30 T F F Y G G C R G K K N N F D R E K Y
	31 T F F Y G G C R G K R N N F L R E K E
	32 T F F Y G G C R G K G N N F D R A K Y
	33 T F F Y G G S R G K G N N F D R A K Y
CARGA(+2)	34 T F F Y G G C R G N G N N F V T A K Y
	35 P F F Y G G C G G K G N N Y V T A K Y
	36 T F F Y G G C L G K G N N F L T A K Y
	37 S F F Y G G C L G N K N N F L T A K Y
HUMANO	38 T F F Y G G C G G N K N N F V R E K Y
HUMANO	39 T F F Y G G C M G N K N N F V R E K Y
HUMANO	40 T F F Y G G S M G N K N N F V R E K Y
HUMANO	41 P F F Y G G C L G N R N N Y V R E K Y
HUMANO	42 T F F Y G G C L G N R N N F V R E K Y
HUMANO	43 T F F Y G G C L G N K N N Y V R E K Y
CARGA(+1)	44 T F F Y G G C G G N G N N F L T A K Y
	45 T F F Y G G C R G N R N N F L T A E Y
	46 T F F Y G G C R G N G N N F K S A E Y
	47 P F F Y G G C L G N K N N F K T A E Y
	48 T F F Y G G C R G N R N N F K T E E Y
	49 T F F Y G G C R G K R N N F K T E E D
HUMANO	50 P F F Y G G C G G N G N N F V R E K Y
HUMANO	51 S F F Y G G C M G N G N N F V R E K Y
HUMANO	52 P F F Y G G C G G N G N N F L R E K Y
HUMANO	53 T F F Y G G C L G N G N N F V R E K Y
HUMANO	54 S F F Y G G C L G N G N N Y L R E K Y
HUMANO	55 T F F Y G G S L G N G N N F V R E K Y
CARGA(+0)	56 T F F Y G G C R G N G N N F V T A E Y
	57 T F F Y G G C L G K G N N F V S A E Y
	58 T F F Y G G C L G N R N N F D R A E Y
HUMANO	59 T F F Y G G C L G N R N N F L R E E Y
HUMANO	60 T F F Y G G C L G N K N N Y L R E E Y
HUMANO	61 P F F Y G G C G G N R N N Y L R E E Y
HUMANO	62 P F F Y G G S G G N R N N Y L R E E Y
Aprotinina vs APROTININA	63 M R P D F C L E P P Y T G P C V A R I
M-term	
(1 hélice α, A-term)	64 A R I I R Y F Y N A K A G L C Q T F V Y G
(2 láminas β, Y-term)	65 Y G G C R A K R N N Y K S A E D C M R T C G
(1 α, 1 β)	66 P D F C L E P P Y T G P C V A R I I R Y F Y
AngioPep	67 T F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y
AngioPep-1	68 K F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y
AngioPEP1 (lisina)	69 T F F Y G G C R G K R N N Y K T E E Y
AngioPEP1 (4Y)	70 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y
Puente cys	71 C T F F Y G C C R G K R N N F K T E E Y
cys-N terminal	72 T F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y C
cys-C terminal	73 C T F F Y G S C R G K R N N F K T E E Y
cys-N terminal	74 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y C
cys-C terminal	75 P F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y
pro	76 T F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y
carga (+3)	77 T F F Y G G K R G K R N N F K T E E Y
carga (+3)-cys	

(continuación)

96 PÉPTIDOS ENCARGADOS A SYNPEP (California, EE.UU.)

Características de proteínas	n.º	Pep	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
carga (+4)	78	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	K	R	Y				
carga (+4)-cys	79	T	F	F	Y	G	G	K	R	G	K	R	N	N	F	K	T	A	E	Y				
carga (+5)	80	T	F	F	Y	G	G	K	R	G	K	R	N	N	F	K	T	A	G	Y				
carga (+6)	81	T	F	F	Y	G	G	K	R	G	K	R	N	N	F	K	R	E	K	Y				
carga (+7)	82	T	F	F	Y	G	G	K	R	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y				
carga (0)	83	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	F	K	T	E	E	Y				
Permut. cys(-)	84	T	F	F	Y	G	C	G	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y				
Permut. cys(+)	85	T	F	F	Y	G	G	R	C	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y				
carga (-4)	86	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	G	N	N	F	D	T	E	E	E				
Q en lugar de F	87	T	F	Q	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y				
Mezcla de ANGIOPEP	88	Y	N	K	E	F	G	T	F	N	T	K	G	C	E	R	G	Y	R	F				
TFPI TFPI (dominio similar)	89	R	F	K	Y	G	G	C	L	G	N	M	N	N	F	E	T	L	E	E				
Carga+5 (HUMANO)	90	R	F	K	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	F	L	R	L	K	Y				
Carga+5 (HUMANO)	91	R	F	K	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	Y	L	R	L	K	Y				
TFPI (c-terminal) (2Y)	92	K	T	K	R	K	R	K	K	Q	R	V	K	I	A	Y	E	E	I	F	K	N	Y	
TFPI (c-terminal truncado)	93	K	T	K	R	K	R	K	K	Q	R	V	K	I	A	Y								
Básico - SynB1	94	R	G	G	R	L	S	Y	S	R	R	F	S	T	S	T	G	R						
Péptidos SynB3	95	R	R	L	S	Y	S	R	R	R	F													
Penetratina (pAntp43-68)	96	R	Q	I	K	I	W	F	Q	N	R	R	M	K	W	K	K							

Deberá entenderse en la presente que si se menciona un "rango" o "grupo de sustancias" con respecto de una característica particular (p. ej., temperatura, concentración, tiempo y similares) de la presente invención, la presente invención se refiere a e incorpora explícitamente en la presente cada uno y todos los miembros específicos y combinaciones de subrangos o subgrupos cualesquiera. De esta manera, cualquier rango o grupo especificado debe ser entendido como una manera abreviada de referirse a cada uno y todos los miembros de un rango o grupo de manera individual así como cada uno y todos los subrangos o subgrupos posibles englobados en ellos; y de manera similar con respecto de cualesquiera subrangos o subgrupos en ellos. De esta manera, por ejemplo

- 5
- 10 - con respecto a una longitud de 19 aminoácidos o menos, se entenderá que se incorporan específicamente en la presente cada una y todas las longitudes individuales, p. ej., una longitud de 18, 17, 15, 10, 5, etc. Por tanto, a menos que se mencione de manera específica, cada rango mencionado en la presente deberá entenderse como inclusive. Por ejemplo, en la expresión de 5 a 19 aminoácidos de longitud se incluyen 5 y 19;
- 15 - y de manera similar con respecto a otros parámetros, tales como secuencias, longitud, concentraciones, elementos.

Ha de entenderse en particular en el presente documento que las secuencias, regiones, porciones definidas en el presente documento incluyen cada una y de y todas las secuencias individuales, regiones, porciones descritas en el presente documento así como cada una y todas las sub-secuencias, sub-regiones, sub-porciones posibles ya sea que tales sub-secuencias, sub-regiones, sub-porciones se definan incluyendo positivamente posibilidades particulares, excluyendo posibilidades particulares o una combinación de los mismos; por ejemplo una definición excluyente para una región puede leerse como sigue: "con la condición de que dicho polipéptido no sea más corto que 4, 5, 6, 7, 8 o 9 aminoácidos. Aunque un ejemplo adicional de una limitación negativa es lo siguiente; una secuencia que comprende SEQ ID NO: X con la exclusión de un polipéptido de SEQ ID NO: Y; etc. Otros ejemplos de limitaciones negativas ejemplares son los siguientes; "distinto de cáncer cerebral" o "distinto de tejido cerebral" o "distinto de células cerebrales".

Breve Descripción de los Dibujos

En los dibujos que ilustran realizaciones ejemplares de la invención.

La Figura 1 es una secuencia de aminoácidos de péptidos derivados de aprotinina;

La Figura 2 es una representación esquemática de la bomba de eflujo, glicoproteína P (P-gp o MDR1) en la superficie celular. La bomba de eflujo, P-gp o MDR1, asociada con resistencia a fármacos múltiples es altamente expresada en la superficie celular de muchas células cancerosas y diversos tejidos, incluyendo la barrera hematoencefálica;

La Figura 3 es una representación esquemática de la conjugación de un fármaco con el péptido portador de la presente invención;

La Figura 4 es un cromatograma que ilustra la producción en alta cantidad del conjugado TxIAn2 (3:1);

La Figura 5 es un análisis de HPLC del pico purificado en una columna hidrófoba usando explorador AKTA;

La Figura 6 es un diagrama que ilustra la perfusión en cerebro *in situ* de Angiopep-2 radiomarbeto y el marcador vascular inulina;

La Figura 7 es un histograma que ilustra el volumen de distribución aparente de transferrina, aprotinina y Angiopep en cerebro total, capilares del cerebro y parénquima de cerebro;

La Figura 8 es un diagrama de proliferación celular en presencia del fármaco parental Taxol. Células de glioblastoma (U-87) fueron expuestas a diversas concentraciones de Taxol por tres días. La ³H-timidina incorporada en células fue graficada como una función de las concentraciones de Taxol;

La Figura 9A es un diagrama que representa la acumulación de diversos fármacos en células MDCK transfectadas con *MDR1* en presencia o ausencia (control) de 10 μ M CsA, un inhibidor de P-gp. El experimento fue llevado a cabo en presencia de DMSO al 1%;

La Figura 9B es un diagrama que representa la acumulación del conjugado en células que sobreexpresan P-gp.

Las figuras 10A y 10B son diagramas que representan distribución en tejidos de Taxol y el conjugado TxIAn1;

La Figura 11 es un diagrama que representa la distribución en pulmón de Taxol y TxIAn1;

La Figura 12 es un diagrama que representa los niveles del conjugado TxIAn1 en plasma y pulmón;

La Figura 13 es un diagrama que representa el efecto del tratamiento con TxIAn2 sobre un crecimiento de tumor de glioblastoma subcutáneo (U-87);

La Figura 14 muestra fotografías que ilustran la detección de β -tubulina en NCI-H460 por inmunofluorescencia o luz visible en células cancerosas expuestas a Taxol o el conjugado TxIAn2; como control, las células fueron expuestas a DMSO al 1%;

La Figura 15 son diagramas que ilustran el efecto de Taxol y el conjugado TxIAn2 sobre el ciclo de células NCI-H460, según se mide por FACS. Las células fueron expuestas por 24 horas con el vehículo (DMSO), Taxol (100 nM) o el conjugado TxIAn2 (30 nM, equivalente a 100 nM de Taxol);

Las Figuras 16A y 16B son fotografías que representan inmunodetección de LRP en biopsias de tumor de cerebro humano;

La Figura 17A es un diagrama que ilustra la acumulación de [¹²⁵I]-RAP en fibroblastos MEF-1 y PEA-13 en presencia de diversas concentraciones de aprotinina;

La Figura 17B es un diagrama que expresa los resultados de La Figura 17A, donde la acumulación de [¹²⁵I]-RAP dependiente de LRP fue calculada restando los resultados de la toma obtenida con células PEA-13 de los resultados con MEF-1 y expresada como una función de las concentraciones de aprotinina;

La Figura 18 es un histograma que ilustra el efecto de aprotinina y Angiopep-2 sobre la toma de RAP. La acumulación de [¹²⁵I]-RAP en fibroblastos MEF-1 y PEA-13 fue medida en presencia de 25 μ M aprotinina o Angiopep. La acumulación de [¹²⁵I]-RAP dependiente de LRP fue calculada restando los resultados para la toma obtenida con células PEA-13 de los resultados obtenidos con MEF-1;

La Figura 19A es un diagrama que ilustra la cinética del conjugado TxIAn2 (3:1) en sangre, en DMSO al 80%, después de una inyección de bolo;

La Figura 19B es un diagrama que ilustra la cinética del conjugado TxIAn2 (3:1) en sangre, en Solutol® HS15 al 20% después de una inyección de bolo;

La Figura 19C es un diagrama que ilustra la cinética de Taxol en sangre, en DMSO al 80%, después de una inyección de bolo;

La Figura 20 son diagramas de distribución del conjugado TxIAn2 (3:1) en tejidos, diluido en DMSO (80%) o Solutol® HS15 (20%).

La Figura 21A es un histograma que ilustra la distribución de Taxol, TxIA_n2 (3:1) y TxIA_n2 (2:1) en tejidos, después de inyección intravenosa (i.v.) en diversos tejidos;

La Figura 21B es un histograma que ilustra la distribución de Taxol, TxIA_n2 (3:1) y TxIA_n2 (2:1) en tejidos, después de inyección intravenosa (i.v.) en cerebro normal y tumoral;

La Figura 22A es una gráfica que ilustra el volumen de un tumor después de administración i.v. de Taxol (10 mg/kg) o una formulación del conjugado TxIA_n2 (3:1) (20 mg/kg) (en Solutol®) en ratones con células NCI-H460 implantadas en su flanco derecho;

La Figura 22B es una gráfica que ilustra el volumen de un tumor después de la administración i.p. de una formulación del conjugado TxIA_n2 (2:1) o TxIA_n2 (3:1) (en Solutol®) en ratones con células NCI-H460 implantadas en su flanco derecho;

La Figura 23A es una gráfica que ilustra el volumen de un tumor después de la administración de ya sea el vehículo (control), Taxol (10 mg/kg) o una formulación de TxIA_n2 (3:1) (20 mg/kg) por inyección o infusión i.p. con bombas Alzet (30 mg/kg/14 días) en ratones con células NCI-H460 implantadas en su flanco derecho; los tratamientos son indicados mediante flechas; y

La Figura 23B es una gráfica que ilustra el volumen de un tumor después de la administración de ya sea el vehículo (control), Taxol (10 mg/kg) o una formulación de TxIA_n2 (3:1) (20 mg/kg) por inyección o infusión i.p. con bombas Alzet en ratones con células U87 implantadas en su flanco derecho; los tratamientos son indicados mediante flechas.

Descripción Detallada de la Invención

Angiopep-1 y Angiopep-2 representan dos ejemplos de péptidos derivados de aprotinina que han sido probados en la presente (figura 1). Taxol que representa la molécula o compuesto conjugado con el portador de la presente invención, fue seleccionado como un fármaco contra el cáncer candidato pues este compuesto natural, aislado de la corteza y agujas del árbol tejo, y es un quimioterapéutico altamente eficiente. Más aún, este compuesto está aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) (Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos) para cáncer de ovarios, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas y sarcoma de Kaposi, y es un agente anticanceroso bien caracterizado.

Ejemplos

Ensayo de Proliferación Celular

Para el ensayo de proliferación celular *in vitro*, se sembraron entre 2,5 y 5 x 10⁴ células U87 o A549 en una microplaca de cultivo de tejidos de 24 pozos, en un volumen final de 1 ml de medio con 10% de suero y se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. El medio fue entonces reemplazado con medio libre de suero e incubado durante la noche. La siguiente mañana, el fármaco fue disuelto nuevamente en sulfóxido de dimetilo (DMSO) y el medio fue reemplazado con medio completo conteniendo el fármaco en diferentes concentraciones, en triplicados. La concentración final de DMSO fue de 0,1%. El control usado es un pozo de microplaca con células y sin fármaco. Las células fueron incubadas por 48 a 72 horas, a 37°C y 5% de CO₂. Después de la incubación, el medio fue cambiado y reemplazado con 1 ml de medio completo conteniendo [³H]-timidina (1 µCi/ensayo). La placa fue incubada a 37°C y 5% de CO₂ por cuatro horas. El medio fue retirado y las células lavadas con PBS calentado a 37°C. Las células fueron fijadas con una mezcla de etanol:ácido acético (3:1), luego lavadas con agua y precipitadas tres veces con 10% de TCA (ácido tricloroacético) frío en hielo. Finalmente, se añadieron 500 µl de PCA (ácido perclórico) a los pozos y las microplacas fueron calentadas por 30 minutos a 65°C y 30 minutos a 75°C. El contenido de cada pozo fue entonces transferido en un frasco de centelleo con 10 ml de un coctel de centelleo y la actividad fue medida en CPM (cuentas por minuto) en un contador de centelleo en líquido Tri-Carb, de Packard.

Yodación de Péptidos

Los péptidos fueron yodados con procedimientos estándar usando perlas de yodo de Sigma. Tanto Angiopep-1 como Angiopep-2 fueron diluidos en amortiguador de fosfato 0,1 M, pH 6,5 (PB). Dos perlas de yodo fueron usadas para cada proteína. Estas perlas fueron lavadas dos veces con 3 ml de PB en un filtro Whatman y resuspendidas en 60 µl de PB. Se añadió ¹²⁵I (1 mCi) de Amersham-Pharmacia Biotech a la suspensión de perlas por 5 minutos a temperatura ambiente. Cada yodación fue iniciada por la adición del péptido (100 µg). Después de una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, el yodo libre fue removido mediante HPLC.

Implante Subcutáneo

A fin de estimar la eficiencia de los conjugados de Taxol y las formulaciones sobre el crecimiento de tumores, se desarrolló un modelo subcutáneo de glioblastomas. En este modelo, $2,5 \times 10^6$ células en 100 μ l de medio celular sin suero conteniendo 1% de metilcelulosa fueron inyectadas por vía subcutánea en el flanco de los ratones. El tumor fue claramente visible y pudo ser medido usando un calibrador de vernier. El volumen estimado del tumor fue entonces graficado como una función del tiempo.

Perfusión de Cerebro de Ratón *In Situ*

La toma de los [125 I]-péptidos en el lado luminal de los capilares de cerebro de ratón fue medida usando el método de perfusión de cerebro *in situ* adaptado en el laboratorio para el estudio de la toma del fármaco en el cerebro de ratón. Resumiendo, la carótida derecha común de ratones anestesiados con cetamina/ xilazina (140/8 mg/kg, i.p.) fue expuesta y ligada al nivel de la bifurcación de la carótida común, rostral a la arteria occipital. La carótida común fue entonces cateterizada rostralmente con tubería de polietileno llena de heparina (25 U/ml) y montada en una aguja calibre 26. La jeringa conteniendo fluido de perfusión ([125 I]-péptidos o [14 C]-inulina en amortiguador Krebs/bicarbonato a un pH de 7,4, gasificado con 95% de O_2 y 5% de CO_2) fue colocada en una bomba de infusión (bomba Harvard PHD 2000; Harvard Apparatus) y conectada al catéter. Antes de la perfusión, se eliminó la contribución del flujo sanguíneo contralateral cortando los ventrículos del corazón. El cerebro fue sometido a perfusión por los tiempos indicados a una tasa de flujo de 1,15 ml/min. Después de 14,5 min de perfusión, el cerebro fue sometido adicionalmente a perfusión por 60 segundos con amortiguador Krebs, para lavar el exceso de [125 I]-proteínas. Los ratones fueron entonces decapitados para terminar la perfusión y se aisló el hemisferio derecho sobre hielo antes de someterse a agotamiento capilar. Alícuotas de los homogenados, sobrenadantes, perlas y productos de perfusión fueron tomadas para medir su contenido en los [125 I]-conjugados por precipitación de TCA y para evaluar el volumen aparente de distribución.

EJEMPLO 1

Preparación de Conjugados

Ya que la resistencia hacia diversos fármacos tales como vincristina, etopósido y doxorubicina es mediada mediante sobreexpresión de P-gp (MDR1) (figura 2), cualesquiera métodos de sobrepasar esta bomba de eflujo pueden potenciar la acción de estos fármacos sobre diversos tipos de cáncer. Sobrepasar P-gp puede, por tanto, ser útil para incrementar la potencia de fármacos que están asociados con resistencia mediada por P-gp. Los portadores descritos en la presente fueron por tanto probados respecto de su capacidad para sobrepasar P-gp.

La conjugación de un fármaco al portador descrito en la presente es ilustrada en la figura 3. Brevemente, a fin de conjugar Taxol con el portador de Angiopep-1 o Angiopep-2, primero se activó el Taxol en un derivado de N-succinimida (2'-NHS-Txl). Luego las aminos encontradas, por ejemplo, en el residuo lisina o aminoterminal de Angiopep-1 o Angiopep-2 reaccionaron sobre este Taxol activado formando un enlace péptido (enlace amida). En Angiopep-1 o Angiopep-2, el amino terminal (en la posición 1) y las lisinas (en las posiciones 10 y 15) fueron capaces de reaccionar con Taxol activado. Por tanto, se encontró que ocurrían múltiples combinaciones de conjugados por la adición de 1, 2 o 3 Taxoles al péptido, dependiendo de la relación molar usada (figura 3). Toda la conjugación fue analizada por medio de HPLC y la conjugación fue confirmada por espectro de masa (Maldi-Tof). Se encontró que el Taxol era capaz de liberarse del portador mediante el corte del enlace éster por esterazas. Por tanto, los conjugados fueron producidos de manera eficiente combinando el portador con un fármaco contra el cáncer.

La producción del conjugado TxIA_n2 (3:1), no comprendido por la presente invención, fue llevada a cabo añadiendo directamente 1 mol equivalente de Angiopep-2 a una solución de 2,5 moles equivalentes de 2'-NHS-Taxol. La reacción fue llevada a cabo en DMSO al 68% en solución de Ringer (pH de 7,3), por una hora a 12°C, y después de retirar el baño frío, por alrededor de 22 horas a temperatura ambiente (figura 4). Angiopep-2, 2'-NHS-Taxol y el conjugado TxIA_n2 (3:1) son mostrados en el cromatograma mediante flechas. Se muestrearon y analizaron alícuotas de la reacción mediante HPLC después de 25 minutos, 2 horas 15 minutos, 5 horas y 23 horas, como se indica en la figura 4. Los picos de Angiopep-2, 2'-NHS-Taxol y el conjugado TxIA_n2 (3:1) son mostrados mediante flechas en el cromatograma. Los resultados de la figura 4 ilustran la desaparición de Angiopep-2 y 2'-NHS-Taxol durante la reacción, principalmente en beneficio del conjugado TxIA_n2 (3:1).

Esta mezcla de productos fue separada mediante cromatografía hidrófoba en una columna RPC de 300 mm con una tasa de flujo de 4 ml/min usando explorador AKTA (figura 5). Para el pico que corresponde al conjugado TxIA_n2 (3:1), se juntan las fracciones, se analizan por medio de HPLC y MS. En la figura 5, el cromatograma superior corresponde a la reacción que está corriendo en t=23 horas, mientras que el inferior corresponde al conjugado TxIA_n2 (3:1), que se ha confirmado mediante espectrometría de masa (peso molecular 5107) después de la purificación AKTA.

EJEMPLO 2 (Ejemplo de referencia)

Perfusión de Cerebro *In Situ* de Conjugados Taxol-Angiopep-2

Para evaluar la toma en el cerebro de Angiopep *in vivo*, la tasa inicial de transporte para [125 I]-Angiopep en parénquima cerebral de ratón fue medida usando perfusión en cerebro *in situ* como se describe en la presente. El cerebro de ratón

fue sometido a perfusión las veces indicadas con ya sea [¹²⁵I]-Angiopep-2 o [¹⁴C]-inulina. Después de la perfusión, el cerebro fue sometido a perfusión adicional por 60 segundos con solución de Ringer para lavar el exceso de moléculas radiomarcadas y luego se aisló el hemisferio derecho en hielo antes de someterse a agotamiento capilar. Se tomaron alícuotas de los homogenados, sobrenadantes, perlas y productos de perfusión para medir su contenido de [¹²⁵I]-Angiopep-2 o [¹⁴C]-inulina. Los resultados obtenidos para la acumulación de estas moléculas en parénquima cerebral son ilustrados en la figura 6. La acumulación de [¹²⁵I]-Angiopep-2 se incrementó como una función del tiempo y es mayor que la del marcador vascular, [¹⁴C]-inulina.

Se comparó adicionalmente la toma inicial en cerebro después de 5 minutos de perfusión para [¹²⁵I]-aprotinina, [¹²⁵I]-transferrina, y [¹²⁵I]-Angiopep (figura 7) (1:1). Los resultados muestran que Angiopep y aprotinina tienen una tasa inicial de transporte mayor que transferrina.

EJEMPLO 3 (Ejemplo de referencia)

Efecto de Conjugados sobre el Crecimiento Celular

En un ensayo *in vitro*, se mostró en la presente que Taxol (sin conjugar) bloquea la proliferación de células de glioblastoma (U-87) con un valor CI_{50} de alrededor de 10 nM (figura 8). El efecto de Taxol conjugado con el portador descrito en la presente sobre la proliferación de diversas líneas celulares fue entonces evaluado y comparado con Taxol no conjugado (referido como Taxol). Como se muestra en la Tabla 3, los valores CI_{50} obtenidos para el conjugado Taxol-Angiopep-2 (TxIA_n2) fueron sumamente similares a los del Taxol sin conjugar en muchas células cancerosas. Las células endoteliales de cerebro de rata (RBE4) fueron menos sensibles que las líneas de células cancerosas probadas. En conclusión, estos resultados indican que la potencia de los conjugados para bloquear la proliferación celular *in vitro* es similar a la de Taxol sin conjugar. Para fines de comparación, los resultados obtenidos fueron expresados en términos de la concentración de Taxol.

Tabla 3. Efecto del Conjugado sobre la Proliferación Celular		
Líneas Celulares	CI_{50} (nM)	
	Taxol	Taxol-Angiopep-2 (3:1)
Glioblastomas		
U-87	9,5	9,7
U-118	7,2	8,1
Carcinoma de pulmón		
NCI-H460	9,3	12,5
A549	3,6	6,0
Calu-3	17,2	25,0
Células endoteliales		
RBE4	137	139

La mayoría de estas células (U-87, U-118, NCI-H460, A549) expresan LRP. Estos datos, sin embargo, no están disponibles para las células RBE4.

EJEMPLO 4

Sobrepasar P-gp por medio de Conjugados

A fin de determinar si los conjugados de la presente invención eran sustratos de P-gp o no, las células MDCK fueron transfectadas de manera estable con *MDR1* (MDCK-MDR1) humana y fueron incubadas de manera subsecuente con fármaco contra el cáncer sin conjugar o con los conjugados de la presente invención. En un primer experimento, células MDCK-MDR1 fueron incubadas con ³H-vinblastina (³H-VBL), rodamina, ³H-Taxol, ¹²⁵I-Taxol-Angiopep-1 (¹²⁵I-TxIA_n1), ¹²⁵I-Taxol-Angiopep-2 (¹²⁵I-TxIA_n2) por una hora a 37°C en presencia o ausencia de 10 μM de ciclosporina A (CsA); un inhibidor competitivo de P-gp (figura 9A). Después de la incubación, las células fueron lavadas y se cuantificó la acumulación de radioactividad dentro de las células o la fluorescencia intracelular. El incremento en la acumulación de estos fármacos es expresado en términos de x-veces en comparación con su respectivo control medido en ausencia de CsA. De esta manera, el valor de control para cada fármaco fue fijado en 1-vez.

En otro experimento, la capacidad de los conjugados para acumularse en células que sobreexpresan P-gp fue monitorizada (figura 9B). Células MDCK-MDR1 fueron incubadas con 50 nM de ya sea ³H-Taxol, ¹²⁵I-Taxol-Angiopep-1 (¹²⁵I-TxIA_n1) o ¹²⁵I-Taxol-Angiopep-2 (¹²⁵I-TxIA_n2) por dos horas a 37°C. Después de la incubación, las células fueron lavadas y se cuantificó la radioactividad acumulada en las células. Los resultados fueron expresados como acumulación de fármaco en pmoles/120 minutos.

Como se muestra en la figura 9A, la acumulación de [³H]-Taxol se incrementó 15 veces en presencia del inhibidor competitivo de P-gp, ciclosporina A (CsA). La acumulación de rodamina y [³H]-vinblastina también se incrementó en 7,5 y 10 veces, respectivamente, en presencia de CsA. Estos resultados demuestran que Taxol, rodamina y vinblastina

son sustratos de P-gp. Sin embargo, la ineficacia de CsA sobre la acumulación de los conjugados tanto [¹²⁵I]-Taxol-Angiopep-1 como [¹²⁵I]-Taxol-Angiopep-2 indica que no son sustratos de P-gp. La acumulación de ambos conjugados, en ausencia de CsA, fue al menos 11 veces mayor que [³H]-Taxol (figura 9B). Estos últimos resultados confirman fuertemente que ambos conjugados sobrepasan la acción de P-gp pues P-gp no es capaz de expulsarlos de las células. Estos resultados demuestran adicionalmente que la presencia de un portador en conjugación con un fármaco contra el cáncer incrementa la potencia del fármaco. Por tanto, los portadores descritos en la presente son útiles para el transporte y/o la acumulación de fármacos dentro de una célula y son especialmente útiles para fármacos que habitualmente son expulsados por P-gp (es decir, fármacos que son sustratos de P-gp).

EJEMPLO 5

Distribución y Farmacocinética de los Conjugados

Se evaluó el impacto de la conjugación del fármaco al portador sobre la distribución del fármaco administrando ya sea ³H-Taxol (5 mg/kg) o ¹²⁵I-Taxol-Angiopep-1 (TxIAn1) (10 mg/kg, equivalentes a 5 mg de Taxol/kg) a ratones. El fármaco contra el cáncer no conjugado y los conjugados fueron inyectados por vía intravenosa (i.v.) en ratones como un bolo. Se recolectaron tejidos en diferentes tiempos (0,25, 0,5, 1 y 4 horas) y se homogeneizaron. A fin de cuantificar la cantidad de ³H-Taxol, se digirieron homogenizados de tejidos con solubilizador de tejidos (soluble) y se añadieron entonces a las muestras 10 ml del centellador de líquidos. La cantidad del conjugado ¹²⁵I-marbetado, en los diferentes tejidos, fue medida después de precipitación con TCA. La radioactividad asociada con los tejidos fue por tanto cuantificada. El área bajo la curva (AUC₀₋₄) fue estimada usando software Prism y fue graficada para los diferentes tejidos (figura 10). Los resultados de la figura 10A indican que los valores AUC₀₋₄ obtenidos para el conjugado son mayores que para Taxol en diversos tejidos, incluyendo cerebro, riñón, hígado y los ojos, lo que indica una mayor acumulación del conjugado en estos tejidos en comparación con el fármaco no conjugado. De manera más particular, los resultados presentados en la figura 10B indican que la acumulación del conjugado es mucho mayor que el fármaco no conjugado en el pulmón.

Los resultados de un experimento similar conducido con el conjugado Taxol-Angiopep-2 son resumidos en la Tabla 4 a continuación. Aunque hay diferencias con los resultados obtenidos para el conjugado TxIAn1, el conjugado de la Tabla 4 también se acumula en los pulmones, el cerebro y el hígado de manera más eficiente que el Taxol no conjugado.

Tabla 4

AUC ₀₋₄ (µg/g de Tejido)			
Tejido	TxIAn2	Taxol	Relación (TxIAn2/Taxol)
Plasma	170	2,2	77,3
Cerebro	0,32	0,07	4,6
Pulmón	3,4	1,1	3,0
Riñón	11,2	8,0	1,4
(continuación)			
AUC ₀₋₄ (µg/g de Tejido)			
Tejido	TxIAn2	Taxol	Relación (TxIAn2/Taxol)
Corazón	5,0	2,5	2,0
Hígado	513	22	23
Ojo	0,99	0,57	1,7
Orina	35,7	88	0,4
Tratamientos equivalentes a 5 mg/kg de Taxol			

La cinética de la acumulación de Taxol y Taxol-Angiopep-1 en el pulmón es también presentada en la figura 11. Los resultados muestran claramente que la cantidad del conjugado medida en los pulmones en diferentes tiempos es mucho mayor que para el fármaco no conjugado. Más aún, también se observó que la acumulación del conjugado en el pulmón es también mucho mayor que su concentración en el suero (plasma) en diversos tiempos (figura 12). Los resultados presentados en las figuras 10, 11 y 12 indican fuertemente que la conjugación de un fármaco contra el cáncer (p. ej., Taxol) con el portador de la presente invención (p. ej., Angiopep-1 o Angiopep-2) modifica la biodistribución del fármaco contra el cáncer y su farmacocinética.

EJEMPLO 6 (Ejemplo de referencia)

Inhibición del Crecimiento de Tumor *In Vivo* (U-87)

La capacidad del conjugado para inhibir el crecimiento tumoral fue a continuación evaluada en un modelo *in vivo* (figura 13). Células U-87 fueron por tanto implantadas por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones y al tercer día luego del implante, los ratones fueron inyectados con el vehículo (DMSO/ Ringer: 80/20; control), Taxol (5 mg/kg) o Taxol-Angiopep-2 (10 mg/kg; equivalentes a 5 mg de Taxol/kg (3 Taxol:1 Angiopep-2)). Se observó que la inhibición

del crecimiento tumoral fue más pronunciada en ratones tratados con el conjugado que en ratones tratados con el fármaco contra el cáncer no conjugado.

De hecho, el día diecisiete luego del implante, el crecimiento tumoral fue inhibido en más de 75% por el conjugado, mientras que el crecimiento tumoral fue inhibido únicamente 34% usando el fármaco no conjugado (Tabla 5). Estos resultados muestran que los conjugados descritos en la presente son más eficientes que el Taxol no conjugado para inhibir el crecimiento tumoral *in vivo*. Finalmente, se midió un nivel de inhibición del crecimiento tumoral 2,2 veces mayor para el conjugado en comparación con el fármaco no conjugado.

Tabla 5. Inhibición del Crecimiento Tumoral con Conjugados

Grupos	Volumen Tumoral (mm ³) (media $\pm$ sem)		Crecimiento Tumoral Δ (mm ³)	Inhibición (%)	T/C (%)
	Días posinyección				
	Día 0*	Día 14**			
Control	79 $\pm$ 7	289 $\pm$ 50	203 $\pm$ 47		100
Taxol (5 mg/kg)	74 $\pm$ 5	219 $\pm$ 52	134 $\pm$ 55	34	66
TxlAn2 (3:1) (t0mBIF)	88 $\pm$ 9	144 $\pm$ 27	56 $\pm$ 32	73	27

Tratamiento equivalente a 5 mg/kg de Taxol

*corresponde a 3 días posimplante (primer tratamiento)

**corresponde a 17 días posimplante (después de 4 tratamientos)

EJEMPLO 7

Mecanismo de Acción de Conjugados

En la figura 14, las células cancerosas de pulmón (NCI-H460) fueron incubadas por 24 horas con ya sea Taxol libre (30 nM) o el conjugado TxlAn2 (10 nM; equivalente a 30 nM de Taxol). Después las células fueron marbetadas para β -tubulina usando un anticuerpo secundario enlazado a FITC. Se tomaron fotografías en modos visible y fluorescente. Estos resultados indican que tanto Taxol como el conjugado Taxol-Angiopep tienen un efecto similar sobre β -tubulina, llevando a su polimerización. Más aún, como se indica en la figura 15, la adición de Taxol y el conjugado Taxol-Angiopep induce un bloque de las células NCI-H460 en la fase G2/M. Los resultados obtenidos para la polimerización de β -tubulina y el ciclo celular sugieren que el conjugado TxlAn tiene un mecanismo de acción similar sobre células cancerosas que el Taxol.

EJEMPLO 8

Efecto de Acumulación de RAP Mediada por LRP

Se mostró previamente en la solicitud de patente internacional PCT/CA2004/00011, que la proteína asociada con el receptor (RAP) inhibía la transcitosis de aprotinina en un modelo *in vitro* de la barrera hematoencefálica. De acuerdo con estos datos se propuso que el receptor relacionado con lipoproteína de baja densidad (LRP) está implicado en la penetración de aprotinina en el cerebro. La inhibición similar del transporte de Angiopep a través de un modelo *in vitro* de la barrera hematoencefálica fue también obtenida (datos no mostrados), sugiriendo que la transcitosis de Angiopep a través de las células endoteliales de cerebro también implicaba a LRP. LRP es un receptor de membrana heterodimérico de 600 kDa, compuesto de dos subunidades: la subunidad α (515 kDa) y la subunidad β (85 kDa). Se llevó a cabo entonces la inmunodetección de LRP para determinar si este receptor es expresado en tumores de cerebro humanos primarios, tales como glioblastomas, y en metástasis de cerebro humano a partir de cáncer de mama, pulmón y melanoma (figura 16). Resumiendo, se separó una cantidad igual de homogenizados de proteína de tumores de cerebro humanos primarios (glioblastomas) o metástasis de cerebro humano mediante electroforesis en gel. Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a la membrana PVDF y se inmunodetectó LRP usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la subunidad α obtenido de Cedarlane Laboratories (Hornby, Ontario, Canadá). Se visualizó LRP mediante un anticuerpo secundario dirigido contra IgG de ratón enlazada a peroxidasa de rábano y reactivos quimioluminiscentes.

Bajo las condiciones experimentales usadas, la subunidad α de LRP fue inmunodetectada en 515 kDa en células U-87 de glioblastoma. También se detectó LRP en todos los tumores de cerebro humanos primarios y metástasis de cerebro humano (figura 16). En contraste, se detectó megalina (LRP2) en solamente una metástasis en cerebro a partir de pulmón (no mostrada). La expresión de LRP en las diferentes biopsias de pacientes puede explicar en parte porqué se observó previamente una mayor acumulación del conjugado Taxol-aprotinina en tumores de cerebro. Finalmente, como la LRP puede estar implicada en el transporte del portador descrito en la presente, estos resultados indican que los conjugados pueden también poner en objetivo células y tumores que expresan este receptor.

A fin de determinar si la transcitosis de aprotinina y Angiopep puede implicar la LRP, su impacto sobre la toma de la proteína asociada con el receptor (RAP), un ligando endógeno para LRP, fue determinado (figura 17A). La toma de RAP fue medida en fibroblastos que expresan LRP (MEF-1) y en fibroblastos que no expresan LRP (PEA-13) (figuras

17A y 17B). La adición de aprotinina inhibió el transporte de [¹²⁵I]-RAP en células LRP positivas en una manera dependiente de la dosis. En contraste, la toma de RAP en células LRP negativas casi no fue afectada por las concentraciones de aprotinina. En la figura 17B se calculó la diferencia entre la toma de [¹²⁵I]-RAP medida en MEF-1 y PEA-13 y se graficó como una función de la concentración de aprotinina. Estos resultados muestran que una porción de la toma de RAP dependiente de LRP puede ser reducida por la aprotinina, indicando que la aprotinina puede interactuar con este receptor. En un experimento diferente (figura 18), la toma de [¹²⁵I]-RAP también fue medida en presencia de un exceso de aprotinina y Angiopep. Los resultados muestran que tanto aprotinina como Angiopep afectan la acumulación de [¹²⁵I]-RAP dependiente de LRP.

En resumen, los datos obtenidos para los conjugados descritos en la presente indican que la conjugación de fármacos contra el cáncer con el portador permiten que se escape el fármaco contra el cáncer de la acción de P-gp y por tanto incrementa su potencia (cuando se conjuga con el portador). Estos conjugados son activos *in vitro* para inhibir la proliferación de células cancerosas. Más aún, los resultados obtenidos con relación al crecimiento del tumor *in vivo* indican que la conjugación del fármaco contra el cáncer con el portador puede incrementar su eficiencia, sobrepasando P-gp, posiblemente poniendo en objetivo al receptor LRP o modificando la farmacocinética o biodisponibilidad del fármaco no conjugado.

Tomados juntos, los datos descritos en la presente indican que los conjugados pueden ser usados contra tumores primarios incluyendo cánceres de mama, pulmón y piel, así como metástasis que se originan a partir de tumores primarios.

EJEMPLO 9

Formulación Mejorada de Conjugados Taxol-Angiopep

Ensayos preliminares llevados a cabo para determinar la solubilidad de los diferentes conjugados TxIAn indicaron que todos los conjugados tenían una baja solubilidad en solución acuosa (p. ej., en solución Ringer/Hepes) debido a la naturaleza altamente hidrófoba del Taxol. Sin embargo, todos los conjugados eran sumamente solubles en sulfóxido de dimetilo (DMSO)/Ringer (80/20%). De esta manera, se determinaron diferentes estrategias para incrementar su solubilidad y reducir la cantidad de DMSO necesaria para su solubilización. De manera interesante, se pudo remover por completo el DMSO de la formulación usando el agente solubilizador Solutol® HS15 (BASF). Por ejemplo, TxIAn2 (3:1), a razón de 5 mg/ml, fue solubilizado de manera eficiente en Solutol® HS15 al 20% y solución Ringer/Hepes, con pH de 5.5. Como este agente ha sido aprobado para diversas aplicaciones relacionadas con fármacos para administración intravenosa (i.v.) e intraperitoneal (i.p.), su uso provee una ventaja comercial a las formulaciones de la presente invención.

Las formulaciones de la presente invención pueden comprender, de esta manera, por ejemplo, a) conjugados Taxol-Angiopep-2, b) Solutol® HS15, y c) una solución acuosa o amortiguador (p. ej., solución Ringer/Hepes a un pH de 5 a 7). La concentración de Solutol® HS15 en la formulación puede alcanzar, por ejemplo, 30%. También puede ser útil una concentración mayor de 30%. La concentración de conjugado puede ser determinada con base en la dosis requerida para tratar de manera eficiente a un paciente.

EJEMPLO 10 (Ejemplo de referencia)

Cinética en Sangre de las Formulaciones Mejoradas

Para estudios de distribución en tejidos y cinética en sangre, se usaron [¹²⁵I]-conjugados yodados (es decir, conjugados [¹²⁵I]-TxIAn) y [³H]-Taxol. Resumiendo, los conjugados TxIAn2 (1 mg) fueron radioyodados usando perlas de yodo y TxI-[¹²⁵I]-An2. El conjugado fue entonces purificado usando una columna conteniendo resina de RPC. El yodo libre fue removido lavando a conciencia la columna con acetonitrilo al 20%. Durante los lavados de la columna, la radioactividad fue contada para determinar la reducción de yodo libre. El conjugado TxI-[¹²⁵I]-An2 fue entonces bajado mediante un lavado con acetonitrilo al 100%. Luego se evaporó el acetonitrilo y el conjugado yodado fue diluido en DMSO al 100% (100 µl). Luego se inyectó una alícuota del conjugado radioyodado HPLC y se recolectaron fracciones para verificar que la radioactividad estaba asociada con las fracciones correspondientes a los conjugados.

Se determinó la cinética en sangre después de inyecciones intravenosas (i.v.), en la vena de la cola, intraperitoneal (i.p.), y subcutánea (s.c.), llevadas a cabo en ratones despiertos (figura 19). Resumiendo, el conjugado TxIAn2 (3:1) fue diluido en DMSO/Ringer-Hepes (80/20) o el Solutol®/Ringer-Hepes (20/80), TxI-[¹²⁵I]-An2. Las inyecciones de ratones CD-1 con las formulaciones fueron entonces llevadas a cabo para obtener una concentración de 10 mg/kg. Después de las inyecciones, se recolectaron fracciones de sangre (50 µl) en el extremo de la cola y se determinó directamente la radioactividad. Usando el mismo protocolo, también se determinó la cinética en sangre de Taxol usando [³H]-Taxol. Se disolvió Taxol en DMSO/Ringer-Hepes (80/20), a una concentración que permite una inyección de 5 mg/kg y luego se añadió [³H]-Taxol (2,5 µCi/inyección). Después de las inyecciones, se recolectaron las fracciones en sangre en el extremo de la cola, se añadió un coctel de centelleo, y se midió la radioactividad en un contador Packard. Los resultados de este experimento son ilustrados en las figuras 19A, 19B y 19C, y son resumidos en la Tabla 6 más adelante.

En resumen, los resultados de la figura 19 y la Tabla 6 muestran que la biodisponibilidad de TxIAn2 es mucho mayor que la biodisponibilidad de Taxol. Por ejemplo, la relación $AUC_{(0-24hrs)} \text{TxIAn2} / AUC_{(0-24hrs)} \text{Taxol}$ es de 169 (es decir, 203,3/1,2).

En términos del Taxol, la relación $AUC_{(0-24hrs)} \text{TxIAn2} / AUC_{(0-24hrs)} \text{Taxol}$ es de 84,7 (es decir, 101,65/1,2). Ya que hay tres moléculas de Taxol en cada molécula de Angiopep-2, la cantidad de Taxol representa alrededor de 0,5 del peso molecular de Angiopep (es decir, 3 x 854/5301). Por tanto, el valor AUC del conjugado (es decir, 203) tiene que ser multiplicado por 0,5 a fin de ser expresado en términos de Taxol.

Además, la biodisponibilidad en sangre de los conjugados TxIAn2 es equivalente después de inyecciones intravenosas e intraperitoneales, mientras que este no es el caso para Taxol. Finalmente, los resultados de la figura 19 y la Tabla 6 indican que la biodisponibilidad en sangre de TxIAn2 es mayor cuando se usa Solutol® como solubilizador en comparación con DMSO.

Tabla 6. El Área Bajo las Curvas de 0 a 24 Horas fue Calculada Usando Software GraphPad

AUC (0-24 h) (µg.h por ml)	Inyección I.V.	Inyección I.P.	Inyección Subcutánea
TxIAn2 (3:1) (DMSO) (10 mg/kg)	98,1	34,7	15,5
TxIAn2 (3:1) (Solutol®) (10 mg/kg)	203,3	211,3	74,5
Taxol (DMSO) (5 mg/kg)	1,2	0,09	0,14

EJEMPLO 11 (Ejemplo de referencia)

Distribución en Tejidos

Se evaluó la distribución de TxIAn2 en tejidos en ratones CD-1 normales después de inyección intravenosa en la vena de la cola de 10 mg/kg de TxIAn2, solubilizado en Solutol®/ Ringer-Hepes (20/80%) o en DMSO/Ringer-Hepes (80/20). Resumiendo, los ratones CD-1 fueron inyectados por la vena de la cola con una formulación de TxIAn2 solubilizado en Solutol® o DMSO y también conteniendo TxI-[¹²⁵I]-An2. En puntos predeterminados en el tiempo, se recolectó una muestra de sangre y los ratones anestesiados fueron sometidos a perfusión con PBS fría. Los tejidos fueron entonces cortados y se midió la radioactividad en un contador gamma.

Los resultados de la figura 20 muestran que el uso de Solutol® permite una mayor distribución del conjugado TxIAn2 (3:1) en la mayoría de los tejidos.

EJEMPLO 12 (Ejemplo de referencia)

Distribución en Tumores de Cerebro

En un intento por evaluar la distribución del conjugado TxIAn2 (3:1) en un modelo de tumor de cerebro, ratones desnudos fueron implantados intracerebralmente con células de cáncer de pulmón NCI-H460. Diez días después del implante, la pérdida de peso en los ratones fue considerable, indicando que los tumores de cerebro estaban bien establecidos. Se evaluó la distribución en tejidos de Taxol, TxIAn2 (3:1) y TxIAn2 (2:1) (figura 21), como se describió anteriormente.

De esta manera, se dio a los ratones una inyección intravenosa de ya sea Taxol (5 mg/kg) solubilizado en DMSO, o TxIAn2 (3:1) (10 mg/kg) o TxIAn2 (2:1) (12,5 mg/kg), cada uno solubilizado en Solutol®. Después de 10 minutos, los ratones fueron sometidos a perfusión sobre hielo usando PBS fría, los órganos fueron recolectados y se midió la radioactividad. Para evaluar la diferencia de acumulación entre cerebro normal y tumor de cerebro, los cerebros fueron cortados a la mitad, con el hemisferio derecho (sitio de inyección de las células tumorales) correspondiendo al cerebro tumoral y el hemisferio izquierdo al cerebro normal.

Los resultados de las figuras 21A y 21B muestran que los conjugados TxIAn2 (3:1) presentan una distribución superior en tumor de cerebro en comparación con cerebro normal (incremento de dos veces), mientras que no se observa diferencia alguna para la distribución de Taxol entre cerebro normal y tumoral. La distribución del conjugado TxIAn2 (3:1) es mucho mayor que la distribución de Taxol en tumor de cerebro (incremento de diez veces) y fue también superior que la distribución de TxIAn2 (2:1) (4,5 veces).

EJEMPLO 13 (Ejemplo de referencia)

Efecto de la Formulación Mejorada de Conjugados de Taxol-Angiopep sobre el Crecimiento de Tumores S.C.

Se condujeron estudios *in vivo* para determinar si la formulación mejorada comprendiendo el conjugado de Taxol-Angiopep podía inhibir el crecimiento de células de cáncer de pulmón (NCI-H460) o el crecimiento de células de

glioblastoma (U87) en un modelo *in vivo* de ratones implantados subcutáneamente con estas células cancerosas.

Resumiendo, los ratones recibieron una inyección subcutánea de $2,5 \times 10^6$ células de glioma U87 humanas o células NCI-H460. Cuando se observó el crecimiento del tumor, los ratones recibieron tratamiento con Taxol libre, conjugados de Taxol-Angiopep, o vehículo, mediante inyecciones i.v. o i.p. Los tratamientos fueron entonces administrados dos veces por semana hasta que se sacrificaron los animales. Los ratones fueron monitorizados cada día respecto de síntomas clínicos y pérdida de peso. El volumen tumoral fue estimado con un calibrador y la siguiente ecuación (volumen tumoral = $\pi/2 \times (\text{longitud (mm)} \times \text{anchura}^2 (\text{mm}))$).

En el primer estudio de crecimiento de tumor subcutáneo, las células NCI-H460 fueron implantadas en el flanco derecho de los ratones (figura 22A). Los ratones recibieron el vehículo, Taxol, o la formulación del conjugado Taxol-Angiopep-2 (3:1) por medio de inyecciones i.v. en la vena de la cola o inyecciones i.p. Los conjugados fueron administrados a un equivalente de 10 mg/kg de Taxol. Los resultados presentados en la figura 22 muestran que la formulación mejorada del conjugado TxIAn2 (3:1) conteniendo Solutol® HS15 al 20% en solución Ringer/ Hepes (pH de 5,5) ocasionó una inhibición mucho más intensa del crecimiento tumoral de NCI-H460 que el Taxol.

Estos resultados también son resumidos en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7				
Moléculas	Volumen Tumoral (mm ³)		Crecimiento Tumoral Δ (mm ³)	T/C (%)
	Días Posinyección			
	Día 0	Día 11		
Solutol	118±11	714±71	596±62	100
Taxol i.v.	112±12	483±63	371±58	62
TxlAn2 (3:1) i.v.	112±18	236±32	124±14	21
TxlAn2 (3:1) i.p.	105±14	221±50	116±37	19
TxlAn2 (2:1) i.p.	111±18	215±70	104±53	17

Estos resultados indican que los conjugados TxIAn son más potentes que Taxol en inhibir el crecimiento de tumores en un entorno *in vivo*. Además, se obtuvieron resultados similares sin importar si el conjugado fue administrado i.v. o i.p. Finalmente, también se obtuvieron resultados similares con conjugados TxIAn comprendiendo dos o tres moléculas de Taxol.

EJEMPLO 14 (Ejemplo de referencia)

Efecto de la Formulación Mejorada de Conjugados de Taxol-Angiopep sobre el Crecimiento de Tumores S.C.

En un estudio adicional, se evaluó el efecto de las formulaciones de conjugados TxIAn2 (3:1) sobre el crecimiento s.c. de NCI-H460 o U87. Los ratones fueron tratados mediante inyecciones i.p. con la formulación mejorada a 20 mg/kg/día por cinco días consecutivos o por infusión con el implante de la bomba mini-osmótica Alzet a una dosis de 2 mg/kg/día por 14 días. Como se muestra en las figuras 23A y 23B, la respuesta de los ratones a la formulación de conjugado TxIAn2 (3:1) fue superior cuando los ratones recibieron la formulación mejorada mediante infusión.

Estos experimentos *in vivo* muestran claramente la eficacia de la formulación mejorada contra el crecimiento tumoral de células de glioblastoma o de cáncer de pulmón. Experimentos similares también indican la eficacia de estas formulaciones mejoradas en prolongar la supervivencia de animales (datos no mostrados).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Angiochem Inc. Beliveau, Richard Demeule, Michel Che, Christian Regina, Anthony

<120> POTENCIACIÓN DE AGENTES ANTICÁNCER

<130> C65364PCEPT2

<150> US 60/699,375

<151> 15-07-2005

<150> US 60/758,532

<151> 13-01-2006

<160> 106

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> polipéptido

<400> 1

Thr Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser
1 5 10 15

Ala Glu Asp

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> polipéptido

<400> 2

Thr Phe Gln Tyr Gly Gly Cys Met Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Thr
1 5 10 15

Glu Lys Glu

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> polipéptido

<400> 3

Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> polipéptido

<400> 4

Ser Phe Tyr Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Lys Asn Asn Tyr Leu Arg
1 5 10 15

Glu Glu Glu

<210> 5
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

<400> 5

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 6
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

<400> 6

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210>7
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

<400> 7

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Lys Asn Asn Tyr Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 8
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

<400> 8

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Lys Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

5 <210> 9
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> polipéptido

<400> 9

Thr Phe Gln Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

15 <210> 10
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> polipéptido

25 <400> 10

Thr Phe Gln Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Lys Asn Asn Phe Lys Arg

1 5 10 15

Ala Lys Tyr

30 <210> 11
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> polipéptido

<400> 11

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

40 <210> 12
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

45

ES 2 744 225 T3

<400> 12

Ala Lys Tyr

<213> Artificial

<400> 13

Ala Lys Tyr

<213> Artificial

<400> 14

Ala Lys Tyr

<213> Artificial

<400> 15

Ala Lys Tyr

<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

5 <400> 16

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Glu Lys Tyr

10 <210> 17
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> polipéptido

<400> 17

Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Lys Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Glu

20 <210> 18
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> polipéptido

<400> 18

30 Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Asp

35 <210> 19
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> polipéptido

<400> 19

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Asp Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

45 <210> 20
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

5 <400> 20

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Lys Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Glu Tyr

10 <210> 21
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> polipéptido

<400> 21

Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Ala Asn Arg Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

20 <210> 22
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> polipéptido

<400> 22

30 Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Lys Lys Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

35 <210> 23
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> polipéptido

<400> 23

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Arg Asn Asn Phe Leu Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

45 <210> 24
<211> 19
<212> PRT

<213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido
 5 <400> 24

 Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Arg Asn Asn Phe Lys Thr
 1 5 10 15

 Ala Lys Tyr
 10 <210> 25
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> polipéptido
 <400> 25

 Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Asn Arg Asn Asn Phe Lys Thr
 1 5 10 15

 Ala Lys Tyr
 20 <210> 26
 <211> 19
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido
 30 <400> 26

 Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Gly Asn Asn Phe Lys Arg
 1 5 10 15

 Ala Lys Tyr
 35 <210> 27
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> polipéptido
 <400> 27

 Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Arg Asn Asn Phe Leu Arg
 1 5 10 15

 Ala Lys Tyr
 45 <210> 28
 <211> 19

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> polipéptido
 <400> 28
 Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Arg Asn Asn Phe Lys Thr
 1 5 10 15
 Ala Lys Tyr
 10
 <210> 29
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> polipéptido
 <400> 29
 20
 Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Gly Asn Asn Phe Lys Ser
 1 5 10 15
 Ala Lys Tyr
 <210> 30
 <211> 19
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido
 30
 <400> 30
 Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Lys Asn Asn Phe Asp Arg
 1 5 10 15
 Glu Lys Tyr
 35
 <210> 31
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> polipéptido
 <400> 31
 Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Leu Arg
 1 5 10 15
 Glu Lys Glu
 45
 <210> 32

<211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> polipéptido
 <400> 32

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Gly Asn Asn Phe Asp Arg
 1 5 10 15

10

Ala Lys Tyr

<210> 33
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> polipéptido

20

<400> 33

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Lys Gly Asn Asn Phe Asp Arg
 1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 34
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

25

<220>
 <223> polipéptido

30

<400> 34

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Thr
 1 5 10 15

Ala Lys Tyr

35

<210> 35
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> polipéptido

45

<400> 35

Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Lys Gly Asn Asn Tyr Val Thr
 1 5 10 15

Ala Lys Tyr

5 <210> 36
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido
 <400> 36
 10 Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Lys Gly Asn Asn Phe Leu Thr
 1 5 10 15
 Ala Lys Tyr
 15 <210> 37
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido
 20 <400> 37
 Ser Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Lys Asn Asn Phe Leu Thr
 1 5 10 15
 Ala Lys Tyr
 25 <210> 38
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> polipéptido
 <400> 38
 Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Lys Asn Asn Phe Val Arg
 1 5 10 15
 35 Glu Lys Tyr
 <210> 39
 <211> 19
 <212> PRT
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido
 45 <400> 39
 Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Met Gly Asn Lys Asn Asn Phe Val Arg
 1 5 10 15
 Glu Lys Tyr

ES 2 744 225 T3

	<210> 40	
	<211> 19	
	<212> PRT	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> polipéptido	
10	<400> 40	
	Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Met Gly Asn Lys Asn Asn Phe Val Arg	
	1 5 10 15	
	Glu Lys Tyr	
15	<210> 41	
	<211> 19	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> polipéptido	
	<400> 41	
	Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Arg Asn Asn Tyr Val Arg	
	1 5 10 15	
	Glu Lys Tyr	
25	<210> 42	
	<211> 19	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> polipéptido	
	<400> 42	
35	Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Arg Asn Asn Phe Val Arg	
	1 5 10 15	
	Glu Lys Tyr	
40	<210> 43	
	<211> 19	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223> polipéptido	
	<400> 43	

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Lys Asn Asn Tyr Val Arg
1 5 10 15

Glu Lys Tyr

<210> 44
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

<400> 44

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gly Asn Asn Phe Leu Thr
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 45
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

<400> 45

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Arg Asn Asn Phe Leu Thr
1 5 10 15

Ala Glu Tyr

<210> 46
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

<400> 46

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Gly Asn Asn Phe Lys Ser
1 5 10 15

Ala Glu Tyr

<210> 47
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

<400> 47

Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Lys Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Ala Glu Tyr

<210> 48
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

<400> 48

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 49
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> polipéptido
<400> 49

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Asp

<210> 50
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

<400> 50

Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Arg
1 5 10 15

Glu Lys Tyr

<210> 51
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

<400> 51

Ser Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Met Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Arg
1 5 10 15

Glu Lys Tyr

<210> 52
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

<400> 52

Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gly Asn Asn Phe Leu Arg
1 5 10 15

Glu Lys Tyr

<210> 53
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

<400> 53

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Arg
1 5 10 15

Glu Lys Tyr

<210> 54
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

<400> 54

Ser Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Gly Asn Asn Tyr Leu Arg
1 5 10 15

Glu Lys Tyr

<210> 55
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

<400> 55

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Leu Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Arg
1 5 10 15

Glu Lys Tyr

5 <210> 56
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> polipéptido

<400> 56

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Thr
1 5 10 15

Ala Glu Tyr

15 <210> 57
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> polipéptido

25 <400> 57

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Lys Gly Asn Asn Phe Val Ser
1 5 10 15

Ala Glu Tyr

30 <210> 58
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> polipéptido

<400> 58

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Arg
1 5 10 15

Ala Glu Tyr

40 <210> 59
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> polipéptido

<400> 59

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Arg Asn Asn Phe Leu Arg
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

5 <210> 60
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> polipéptido

<400> 60

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Lys Asn Asn Tyr Leu Arg
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

15 <210> 61
<211> 19
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

25 <400> 61

Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Tyr Leu Arg
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

30 <210> 62
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> polipéptido

<400> 62

Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Gly Gly Asn Arg Asn Asn Tyr Leu Arg
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

40 <210> 63
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> polipéptido

<400> 63

Met Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Val
1 5 10 15

Ala Arg Ile

5

<210> 64
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>

<223> polipéptido
<400> 64

15

Ala Arg Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln
1 5 10 15

Thr Phe Val Tyr Gly
20

<210> 65
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial

20

<220>
<223> polipéptido

25

<400> 65

Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Tyr Lys Ser Ala Glu Asp
1 5 10 15

Cys Met Arg Thr Cys Gly
20

30

<210> 66
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial

35

<220>
<223> polipéptido

<400> 66

Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Val Ala Arg
1 5 10 15

Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr
20

40

<210> 67
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

45

<220>
<223> polipéptido

5 <400> 67

Thr	Phe	Phe	Tyr	Gly	Gly	Cys	Arg	Gly	Lys	Arg	Asn	Asn	Phe	Lys	Thr
1				5					10					15	

Glu Glu Tyr

10 <210> 68
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> polipéptido

<400> 68

Lys	Phe	Phe	Tyr	Gly	Gly	Cys	Arg	Gly	Lys	Arg	Asn	Asn	Phe	Lys	Thr
1				5					10					15	

Glu Glu Tyr

20 <210> 69
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> polipéptido

<400> 69

30

Thr	Phe	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Cys	Arg	Gly	Lys	Arg	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
1				5					10					15	

Glu Glu Tyr

35 <210> 70
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> polipéptido

<400> 70

Thr	Phe	Phe	Tyr	Gly	Gly	Ser	Arg	Gly	Lys	Arg	Asn	Asn	Phe	Lys	Thr
1				5					10					15	

Glu Glu Tyr

45 <210> 71
<211> 20
<212> PRT

ES 2 744 225 T3

5 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido
 <400>71
 Cys Thr Phe Phe Tyr Gly Cys Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys
 1 5 10 15
 Thr Glu Glu Tyr
 20
 10 <210> 72
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> polipéptido
 <400> 72
 Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
 1 5 10 15
 Glu Glu Tyr Cys
 20
 20 <210> 73
 <211> 20
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido
 30 <400> 73
 Cys Thr Phe Phe Tyr Gly Ser Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys
 1 5 10 15
 Thr Glu Glu Tyr
 20
 35 <210> 74
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> polipéptido
 <400> 74

ES 2 744 225 T3

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr Cys
20

<210> 75
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

<400> 75

Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 76
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

<400> 76

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Lys Glu Tyr

<210> 77
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

<400> 77

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Lys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 78
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> polipéptido

<400> 78

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

5 Lys Arg Tyr

<210> 79

<211> 19

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> polipéptido

15 <400> 79

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Lys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Ala Glu Tyr

<210> 80

20 <211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> polipéptido

<400> 80

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Lys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Ala Gly Tyr

30

<210>81

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> polipéptido

<400>81

40

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Lys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Glu Lys Tyr

<210> 82

<211> 19

45 <212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

5 <400> 82

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Lys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

10 <210> 83
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> polipéptido

<400> 83

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

20 <210> 84
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> polipéptido

<400> 84

30 Thr Phe Phe Tyr Gly Cys Gly Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

35 <210> 85
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> polipéptido

<400> 85

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Arg Cys Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

45 <210> 86
<211> 19
<212> PRT

<213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido
 5 <400> 86

 Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Gly Asn Asn Phe Asp Thr
 1 5 10 15

 Glu Glu Glu
 10 <210> 87
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> polipéptido
 <400> 87

 Thr Phe Gln Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
 1 5 10 15

 Glu Glu Tyr
 20 <210> 88
 <211> 19
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido
 30 <400> 88

 Tyr Asn Lys Glu Phe Gly Thr Phe Asn Thr Lys Gly Cys Glu Arg Gly
 1 5 10 15

 Tyr Arg Phe
 35 <210> 89
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> polipéptido
 <400> 89

 Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr
 1 5 10 15

 Leu Glu Glu
 45 <210> 90
 <211> 19

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> polipéptido
 <400> 90
 Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Lys Asn Asn Phe Leu Arg
 1 5 10 15
 Leu Lys Tyr
 10
 <210>91
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> polipéptido
 <400> 91
 20
 Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Lys Asn Asn Tyr Leu Arg
 1 5 10 15
 Leu Lys Tyr
 <210> 92
 <211> 22
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido
 30
 <400> 92
 Lys Thr Lys Arg Lys Arg Lys Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr Glu
 1 5 10 15
 Glu Ile Phe Lys Asn Tyr
 20
 35
 <210> 93
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> polipéptido
 <400> 93
 Lys Thr Lys Arg Lys Arg Lys Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr
 1 5 10 15
 45
 <210> 94
 <211> 17
 <212> PRT

<213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido
 5
 <400> 94

 Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Phe Ser Thr Ser Thr Gly
 1 5 10 15

 Arg
 10
 <210> 95
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> polipéptido
 <400> 95

 Arg Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe
 1 5 10
 20
 <210> 96
 <211> 16
 <212> PRT
 25
 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido
 30
 <400> 96

 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15
 35
 <210> 97
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40
 <223> polipéptido
 <400> 97

 Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
 1 5 10 15

 Glu Glu Tyr
 45
 <210> 98
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> polipéptido

ES 2 744 225 T3

<400> 98

Met Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Val
1 5 10 15

Ala Arg Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln
20 25 30

Thr Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser
35 40 45

Ala Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala
50 55

5 <210> 99
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> polipéptido

<400> 99

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

15 Lys Glu Tyr

<210> 100
<211> 19
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

25 <400> 100

Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Lys Asn Asn Tyr Leu Arg
1 5 10 15

Leu Lys Tyr

30 <210> 101
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> polipéptido

<400> 101

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 102
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

<300>
<310> US 5,807,980
<311> 01-07-1993
<312> 15-09-1998

<400> 102

Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln Thr Phe Val Tyr Gly Gly Cys Leu
1 5 10 15

Ala Lys Arg Asn Asn Phe Glu Ser Ala Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys
20 25 30

Gly Gly Ala
35

<210> 103
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

<300>
<310> US 5,780,265
<311> 05-07-1995
<312> 14-07-1998

<400> 103

Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala Glu Asp
1 5 10 15

Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala
20

<210> 104
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido

<300>
<310> WO04/060403

<311> 05-01-2004

<312> 22-06-2004

<400> 104

5

Gly Leu Cys Gln Thr Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn
1 5 10 15

Asn Phe Lys Ser Ala Glu
20

<210> 105

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> polipéptido

15

<300>

<310> US 5,118,668

<311> 20-07-1998

<312> 02-06-1992

20

<400> 105

Leu Cys Gln Thr Phe Val Tyr Gly Gly Cys Glu Ala Lys Arg Asn Asn
1 5 10 15

Phe Lys Ser Ala
20

25

<210> 106

<211> 180

<212> ADN

<213> Artificial

30

<220>

<223> construcción sintética

<300>

<308> X04666

<309> 1993-09-13

<313> (217)..(396)

35

<400> 106

atgagaccag atttctgcct cgagccgccg tacactgggc cctgcaaagc tcgtatcatc 60

cgttacttct acaatgcaaa ggcaggcctg tgtcagacct tcgtatacgg cggctgcaga 120

gctaagcgta acaacttcaa atccgcggaa gactgcatgc gtacttgccg tgggtgcttag 180

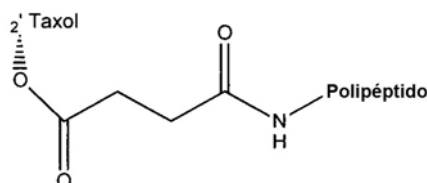
40

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, que comprende:

- (a) un polipéptido que comprende un análogo biológicamente activo de Angiopep-1, en donde dicho análogo tiene al menos un 80 % de identidad a Angiopep-1 (SEQ ID NO: 67), en donde dicho polipéptido es capaz de promover la acumulación de un fármaco dentro de una célula que expresa P-gp en su superficie o una célula que es capaz de expresar P-gp en su superficie; y
(b) 1, 2 o 3 moléculas de Taxol,

en donde dicho Taxol está conjugado a dicho polipéptido a los restos de lisina en la posición 10 y 15 y/o al N-terminal como se muestra a continuación:



2. El conjugado de la reivindicación 1, en donde dicha secuencia de aminoácidos es al menos un 90 % idéntica a Angiopep-1.

3. El conjugado de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho polipéptido o dicho conjugado es capaz de acumularse en el cerebro, el riñón, el hígado, el páncreas, el colon, el pulmón o el ojo.

4. Una composición farmacéutica, que comprende el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un portador farmacéuticamente aceptable.

5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, que comprende además un solubilizante, en donde dicho solubilizante es un éster de polioxietileno de un ácido graso, preferentemente Solutol®HS-15.

6. El conjugado o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para utilizar en un método para tratar el cáncer o cáncer metastásico.

7. El conjugado o la composición farmacéutica para utilizar como se describe en la reivindicación 6, en donde dicho cáncer es un cáncer de cerebro, preferentemente un glioblastoma o un glioma; en donde dicho cáncer está ubicado fuera del cerebro, preferentemente un tumor de pulmón, un tumor de mama, un tumor de riñón, un tumor de ojo, un tumor de hígado, un tumor colorrectal, o un tumor de un órgano urinario; o en donde dicho cáncer es un cáncer metastásico de un tumor de mama, un tumor de pulmón, un melanoma o un tumor de cerebro.

8. El conjugado o la composición farmacéutica para utilizar como se describe en la reivindicación 6 o 7, en donde dicho método para tratar el cáncer implica la administración intraarterial, intranasal, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica o per os.

Angiopep-1 frente a Angiopep-2

Angiopep-1:

TFFYGGCRGKRNNFKTEEY

Angiopep-2:

TFFYGGSRGKRNNFKTEEY

FIG-1



- Bomba de eflujo de fármaco
- Niveles de expresión elevados en la barrera hematoencefálica
- Limita el paso de mucho fármaco hacia el cerebro

FIG-2

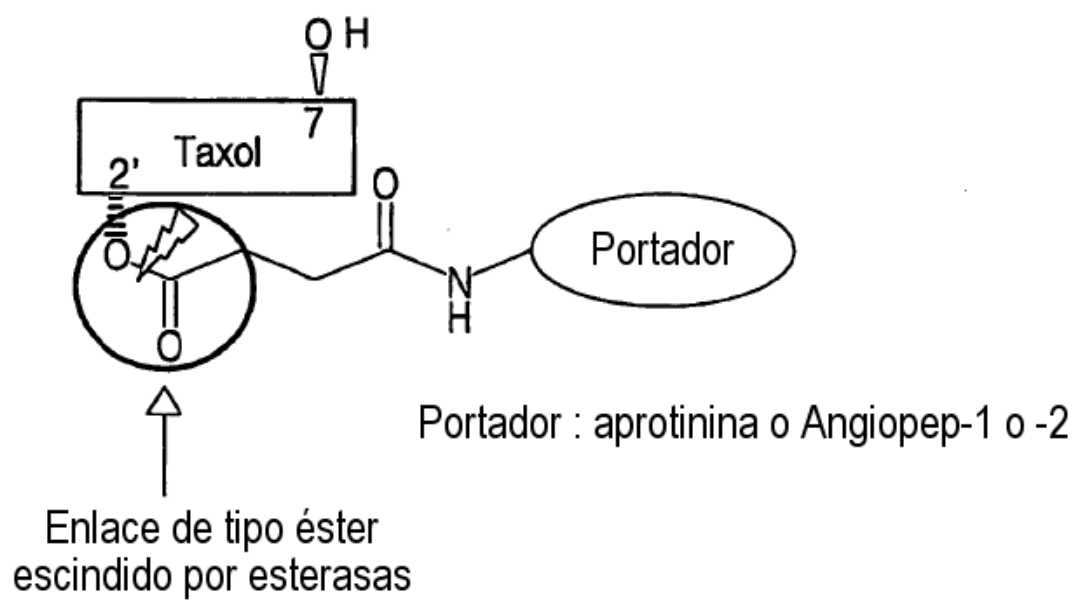


Fig-3

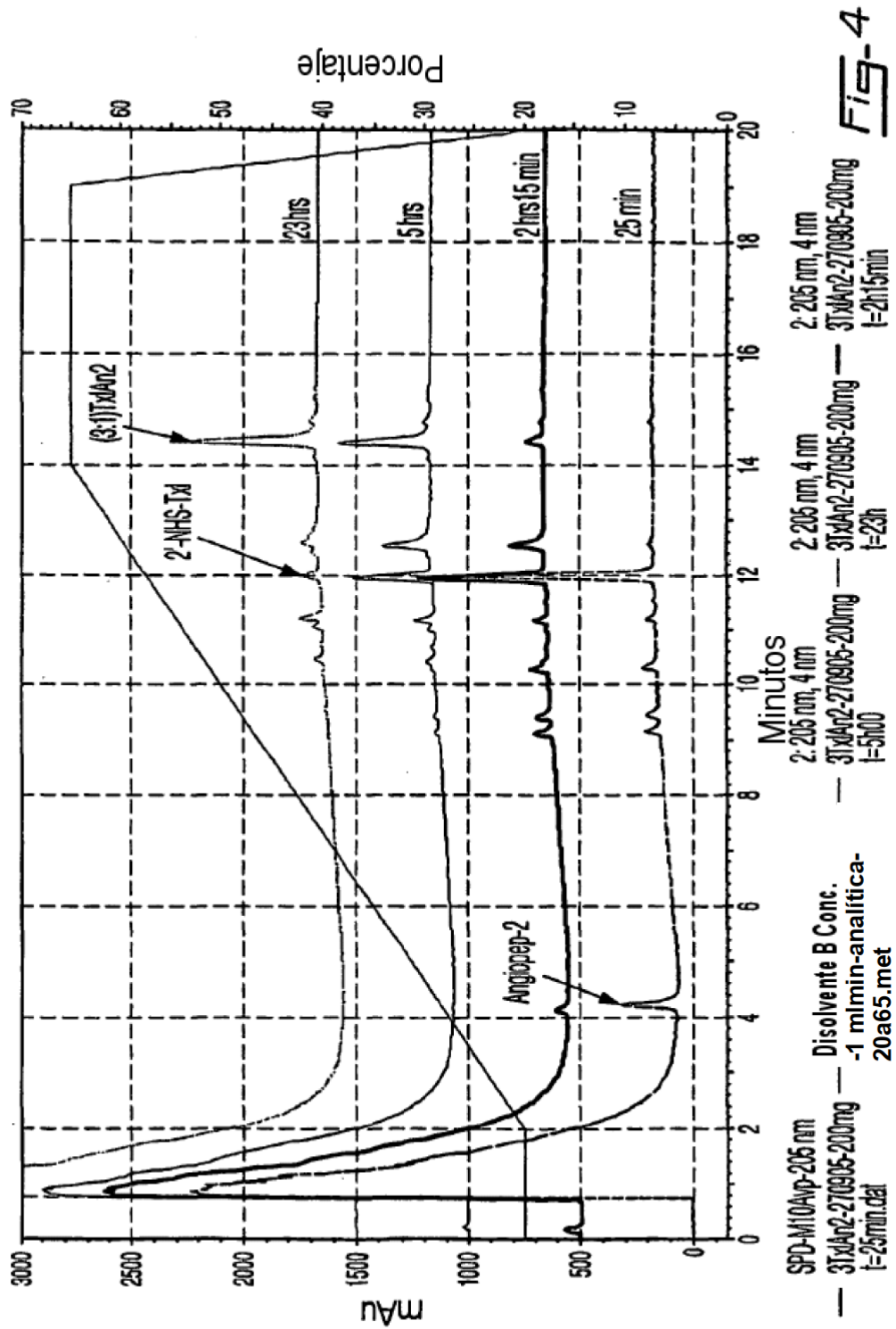
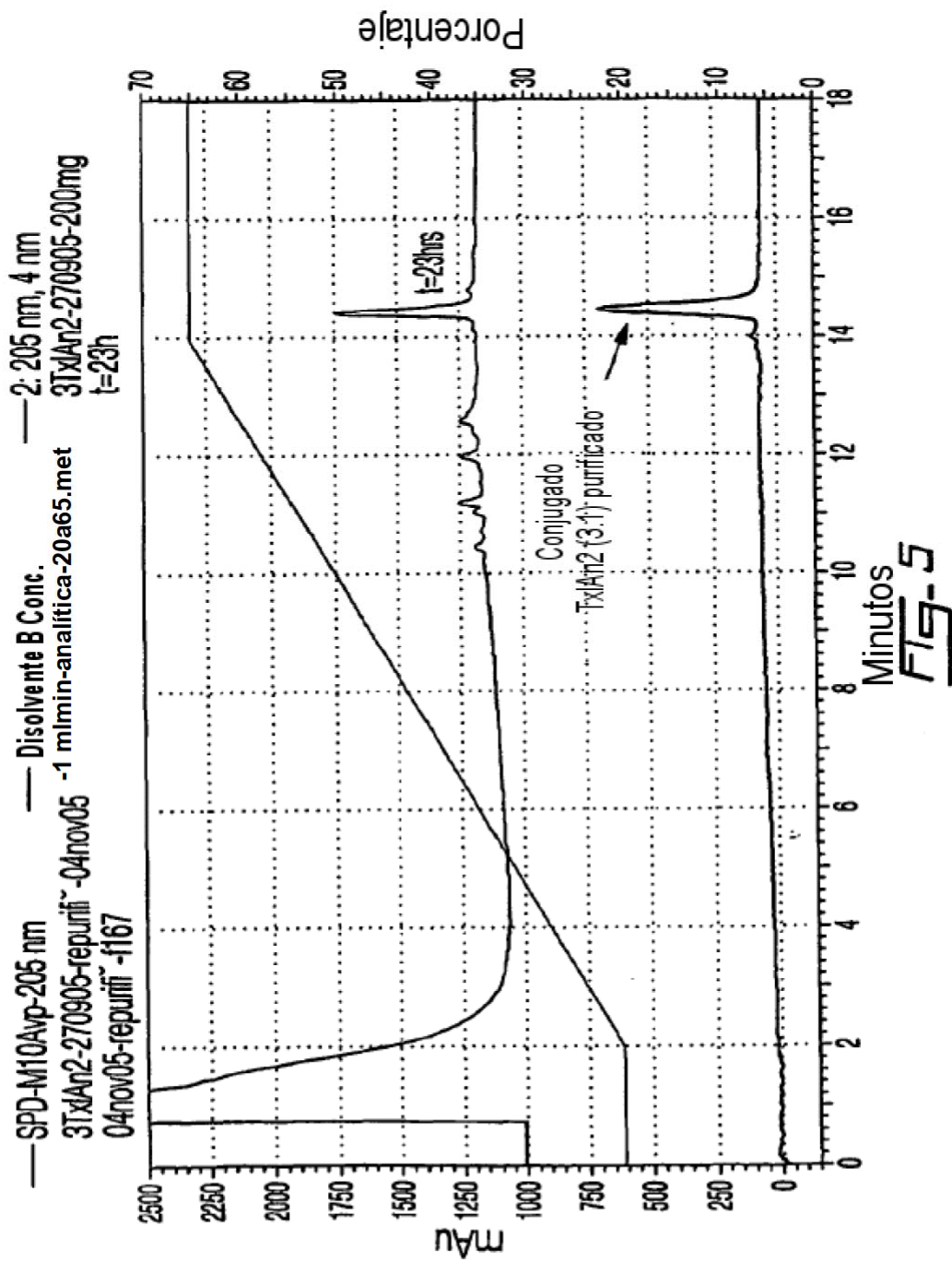


Fig-4



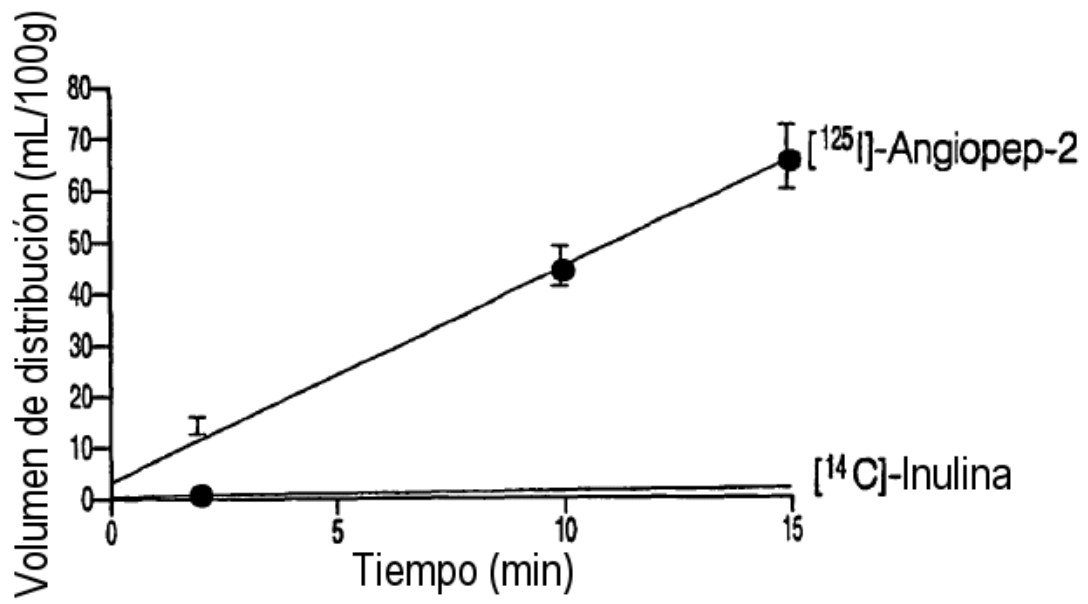


Fig-6

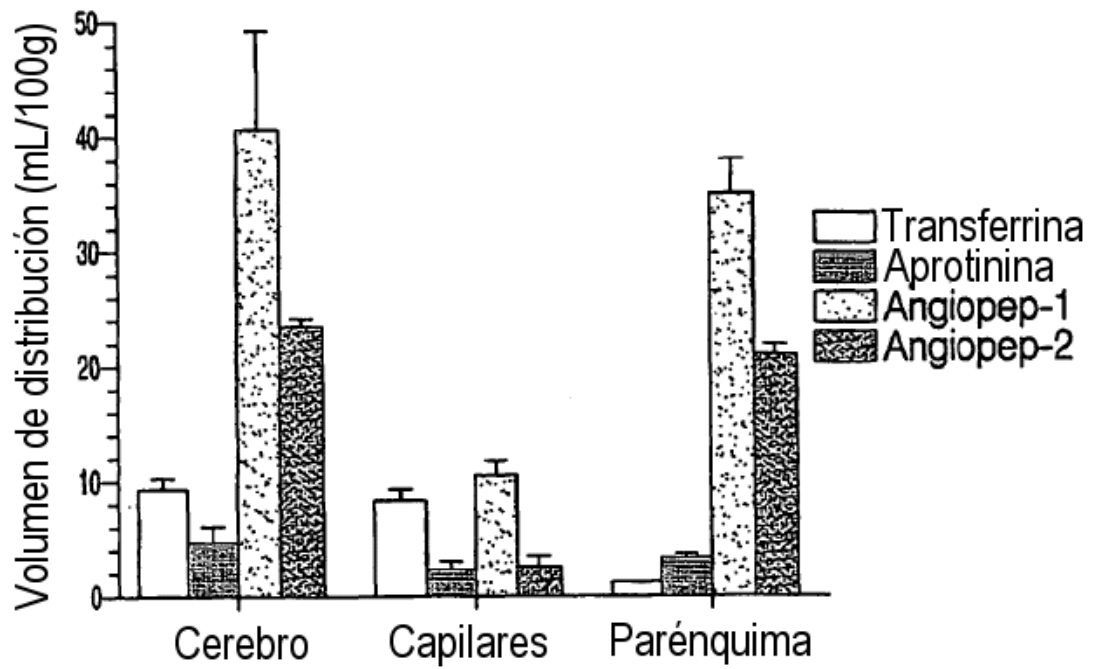


Fig-7

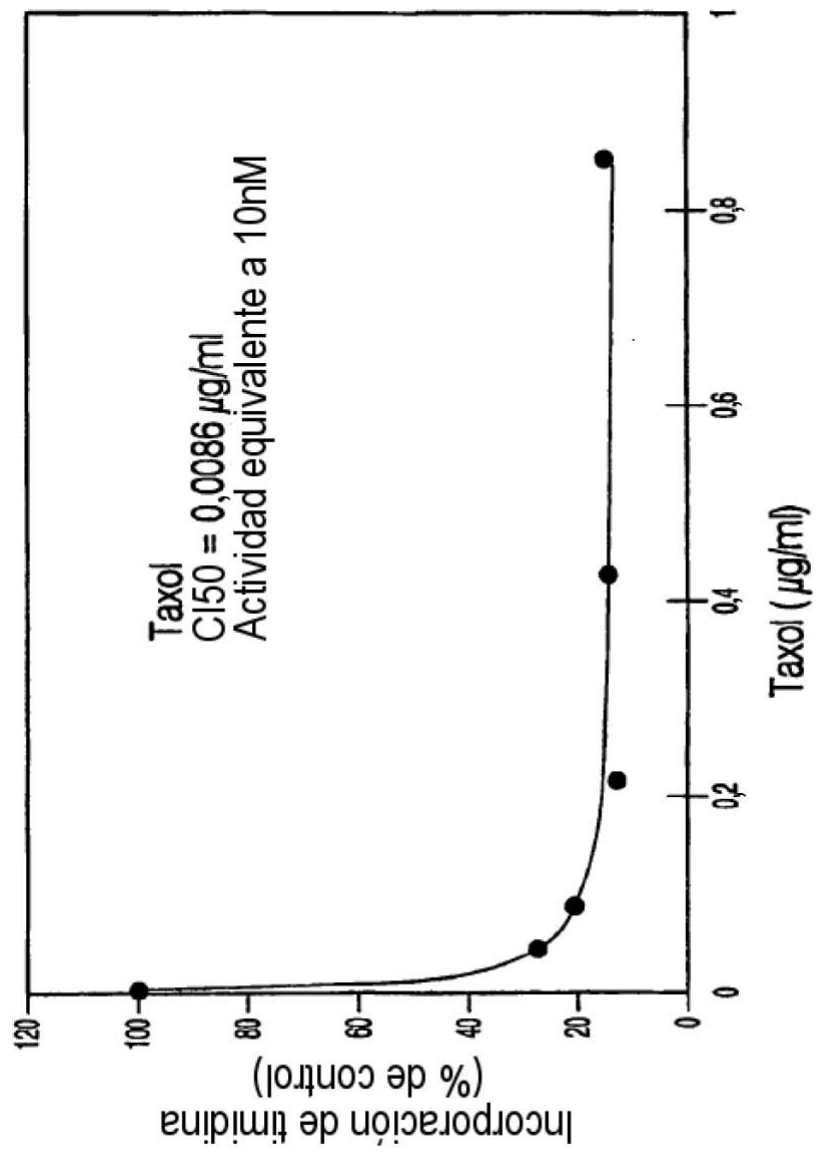


Fig. 8

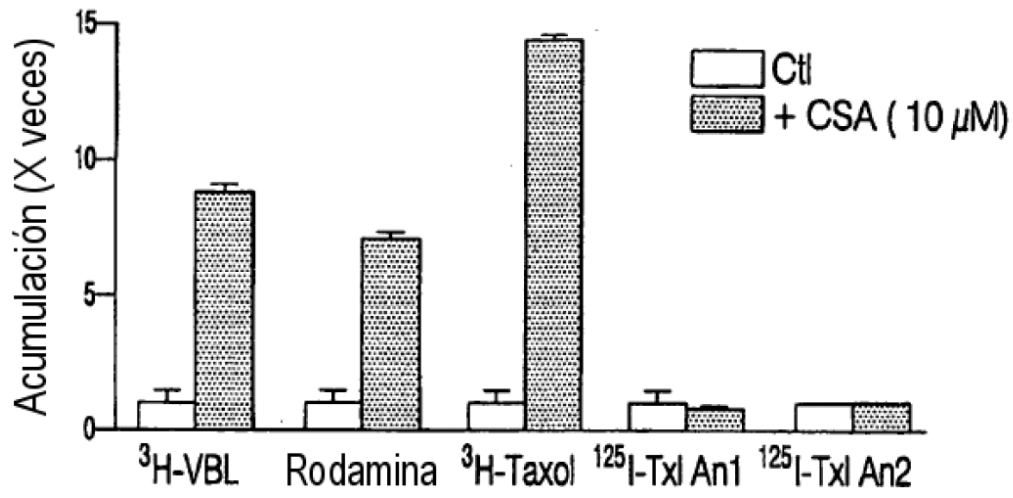


Fig- 9A

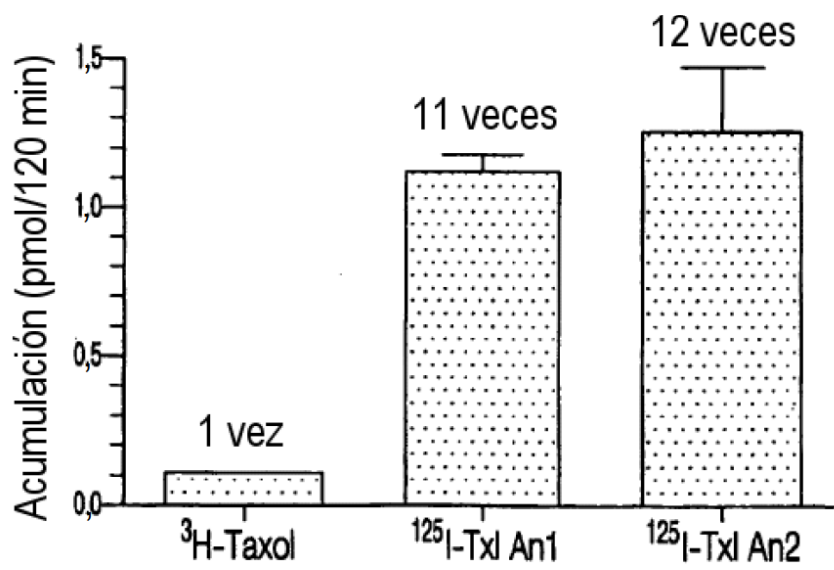
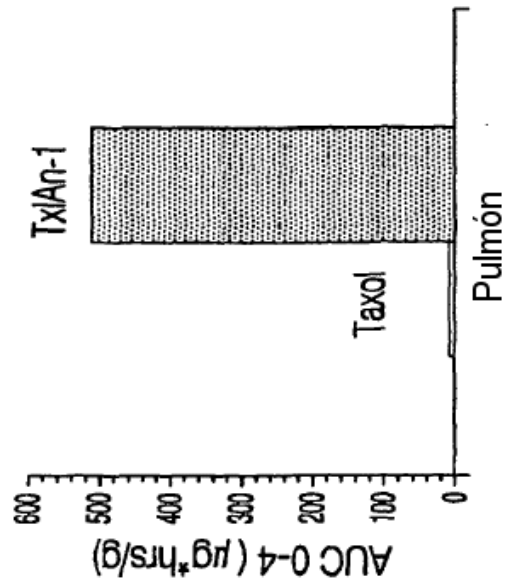
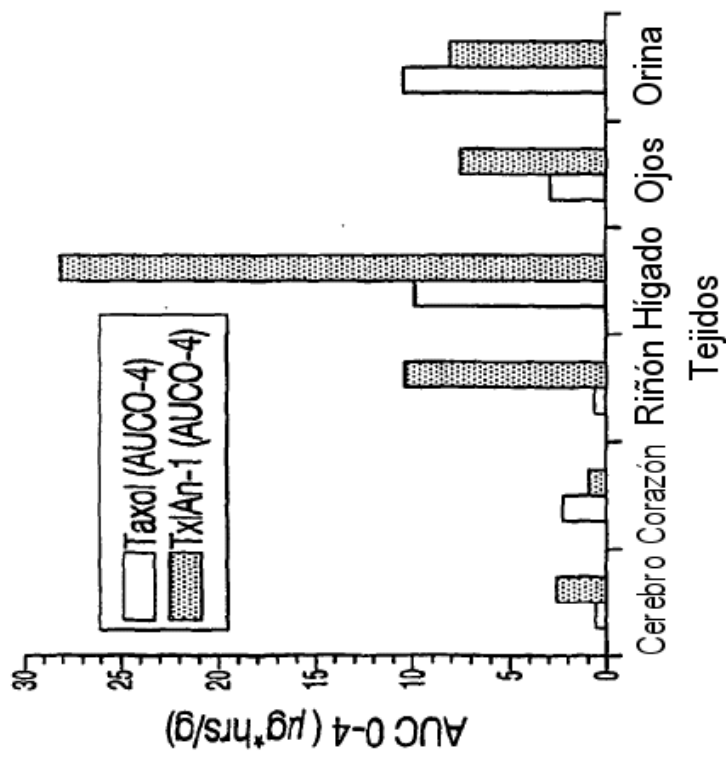


Fig- 9B



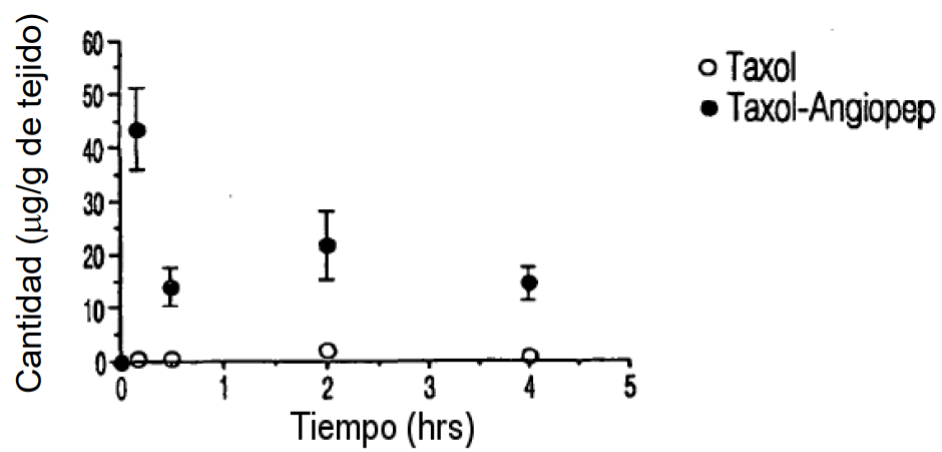


FIG-11

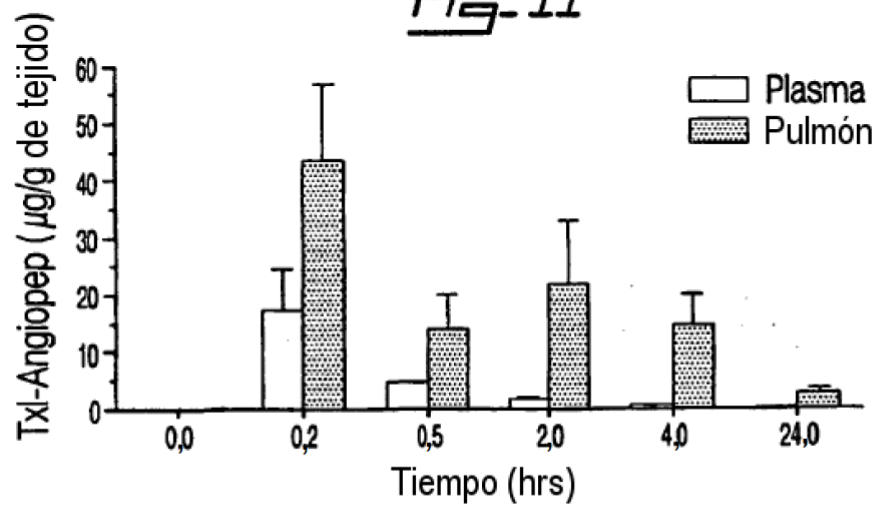
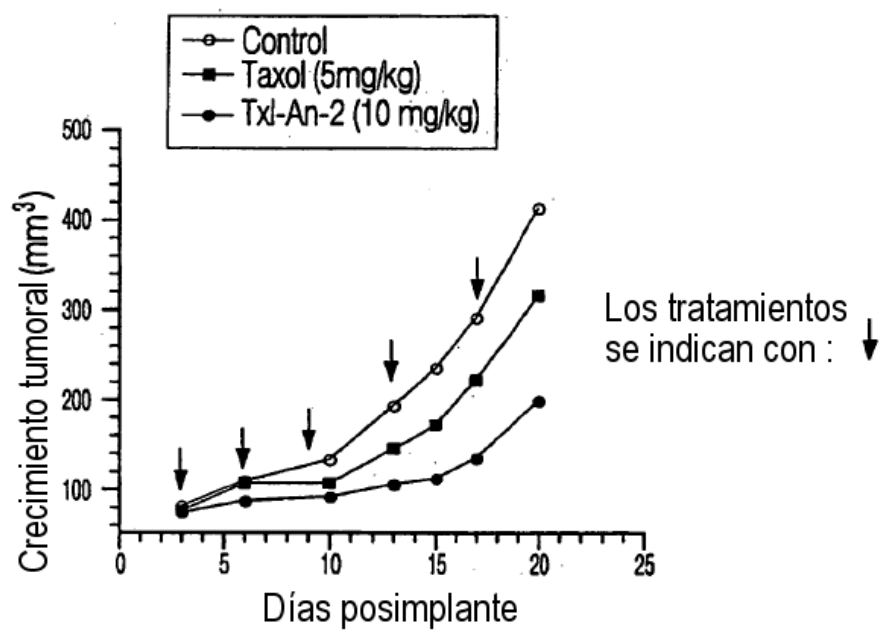
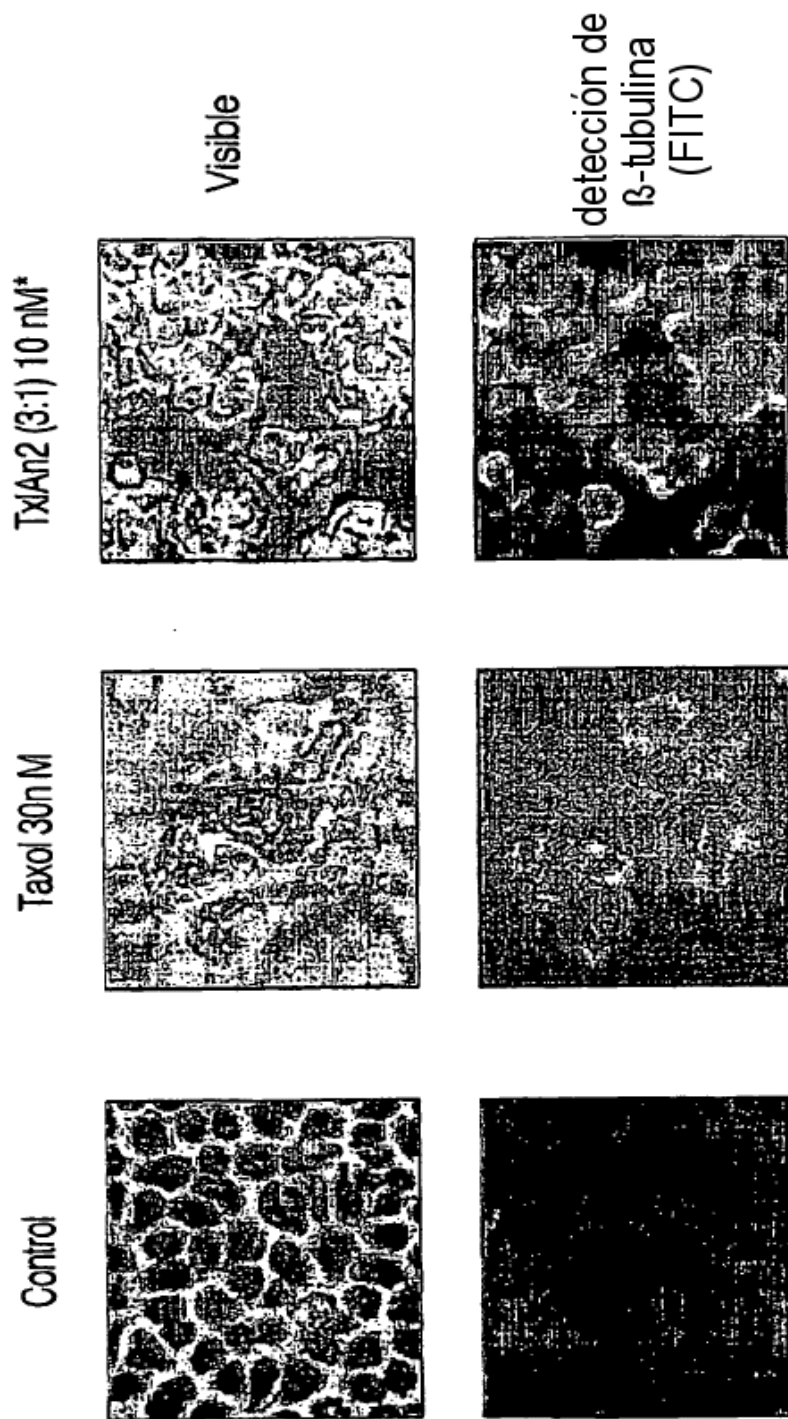


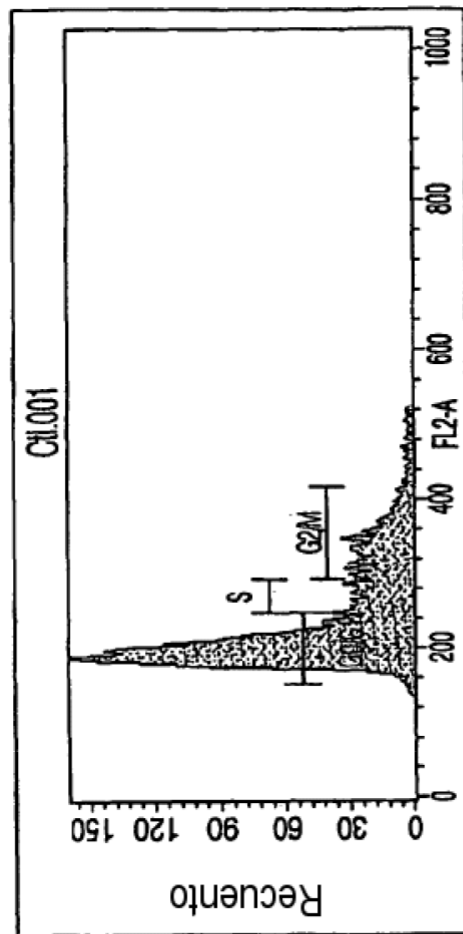
FIG-12

Fig-13



* Conjugado TxlAn2 (3:1) equivalente a 30 nM de Taxol (24 hrs de tratamiento)

Fig-14



Archivo: Ctl001			
ID de la muestra: Ctl			
ID del paciente:			
Fecha de adquisición: 03-Abr-06			
Límite: G2			
Marcador	Eventos	% Seleccionado	
Todos	9035	100,00	
G0-G1	6273	69,43	
S	985	10,90	
G2M	1747	19,34	

Control

FIG-15A

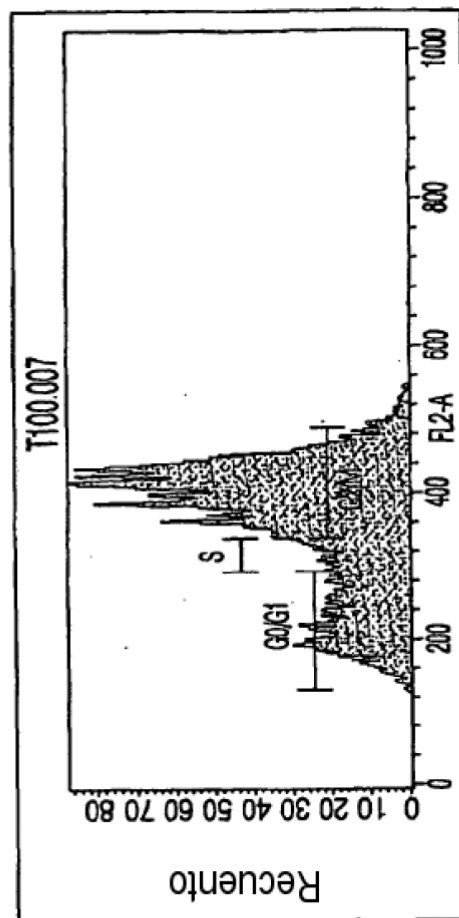


Fig-15B

Archivo: T100.007 ID de la muestra: T100 ID del paciente: Fecha de adquisición: 03-Abr-06 Límite: G2			
Marcar	Eventos	%	Seleccionado
Todos	9356	100.00	
G0-G1	2104	22.49	
S	821	8.78	
G2/M	6373	68.12	

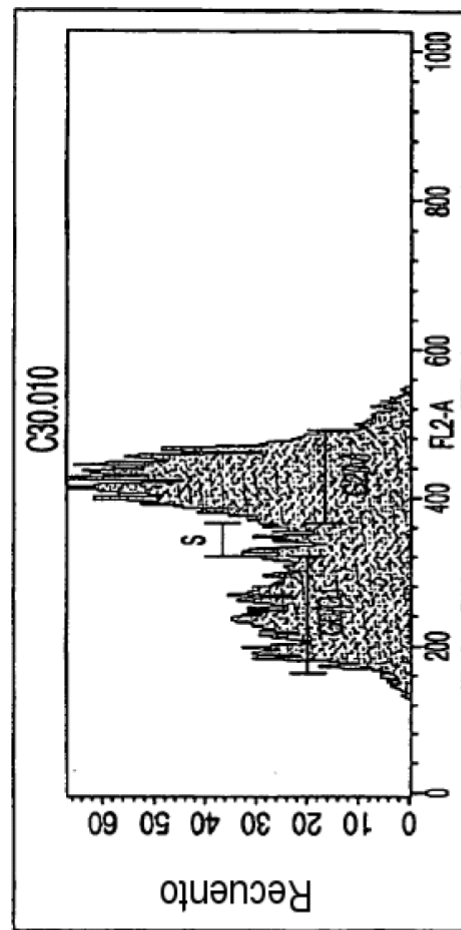


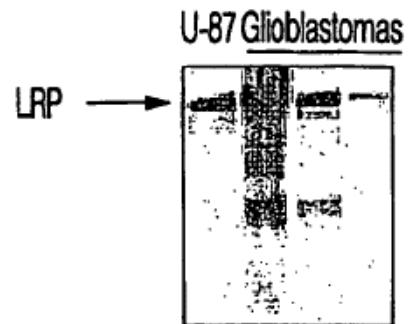
FIG-15C

Tx/An2(3:1)
(30nM)

Archivo: C30.010	
ID de la muestra: C30	
ID del paciente:	
Fecha de adquisición: 03-Abr-06	
Límite: G2	
Marcador	Eventos % Seleccionado
Todos	9255 100,00
G0-G1	3379 36,51
S	880 9,51
G2/M	4851 52,41

Expresión de LRP en tumores cerebrales

A. Tumores cerebrales primarios



B. Metastasis cerebral de

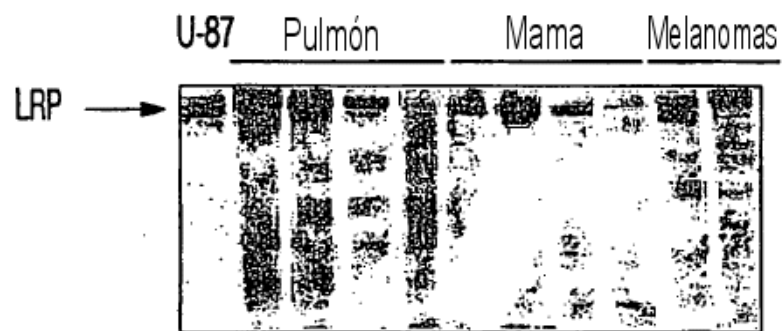


Fig-16

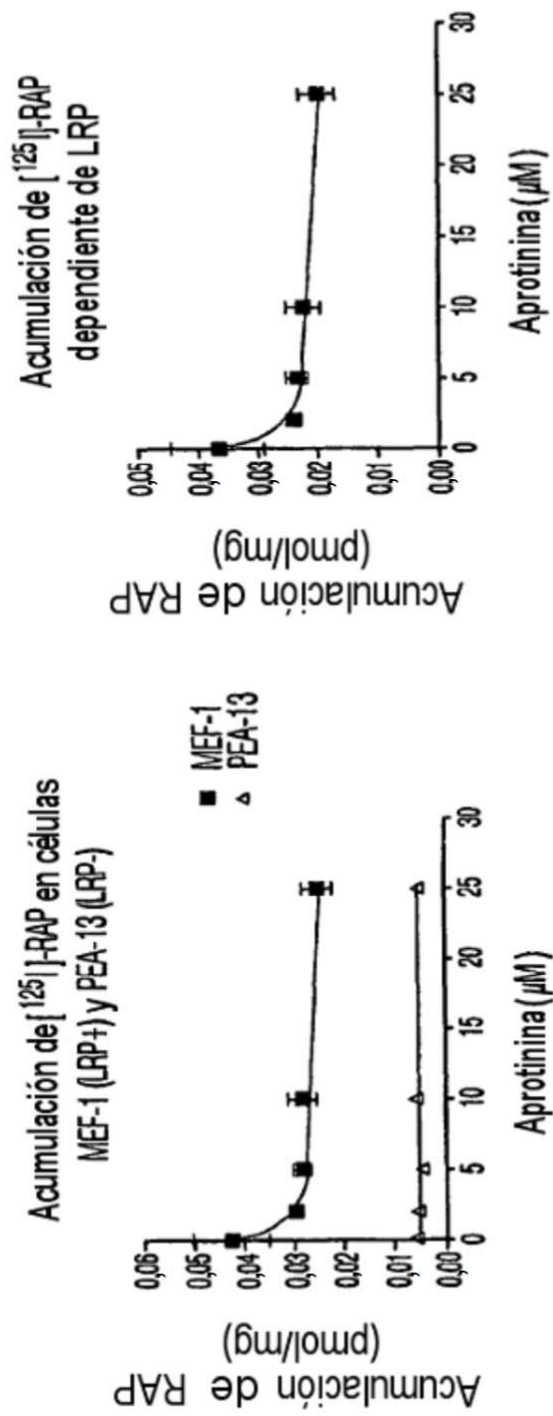
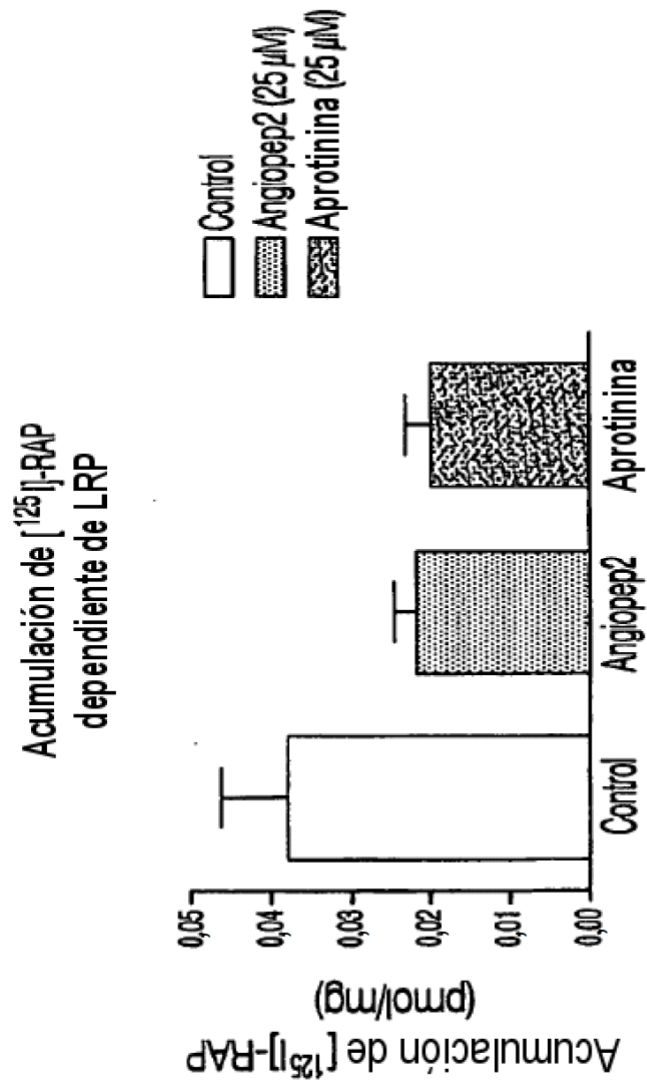


Fig-17A

Fig-17B

**FIG-1B**

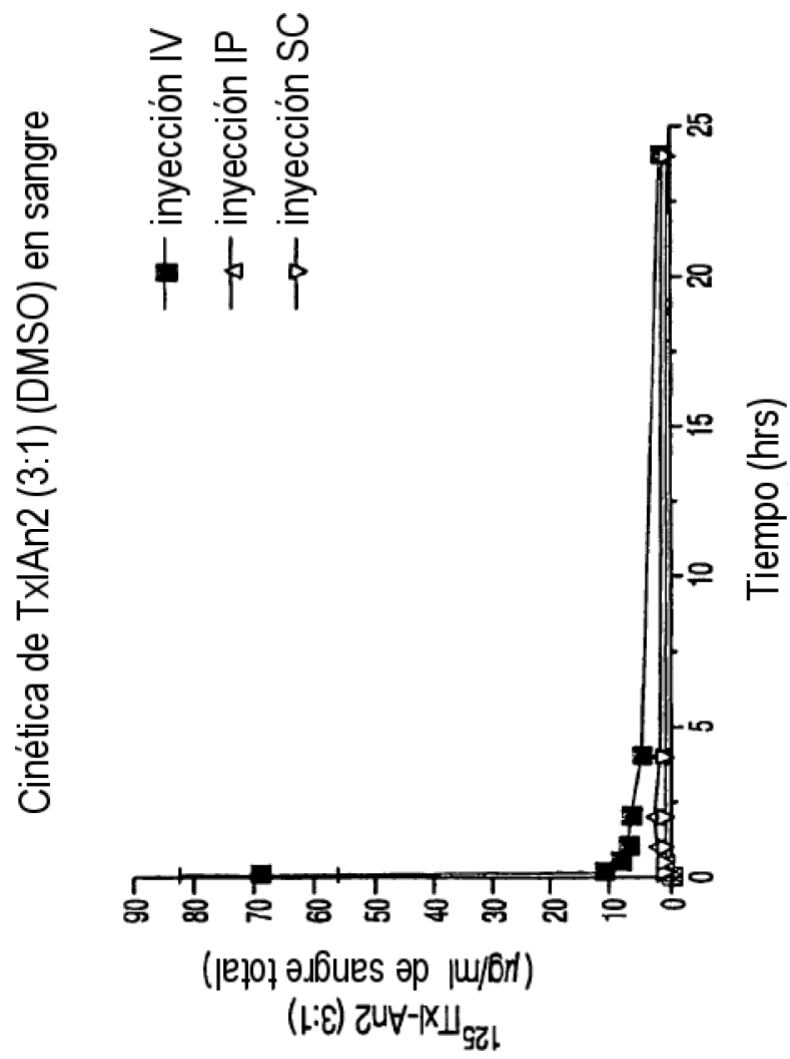


FIG-19A

Cinética de TxIAn2 (3:1) (soluto) en sangre

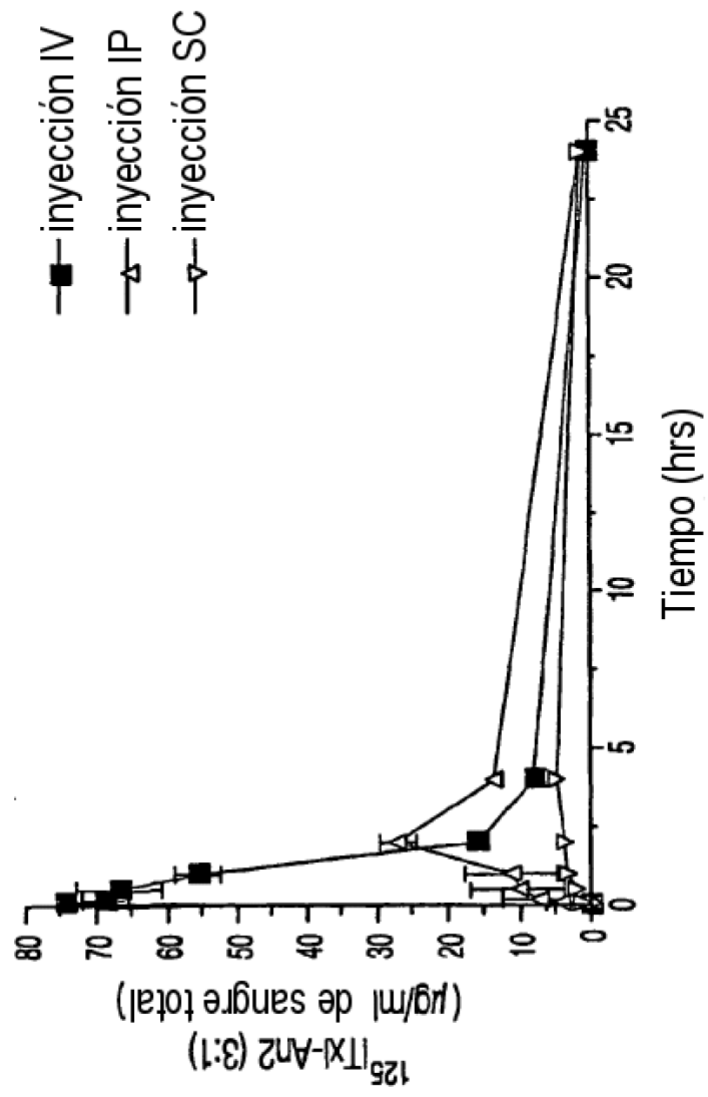
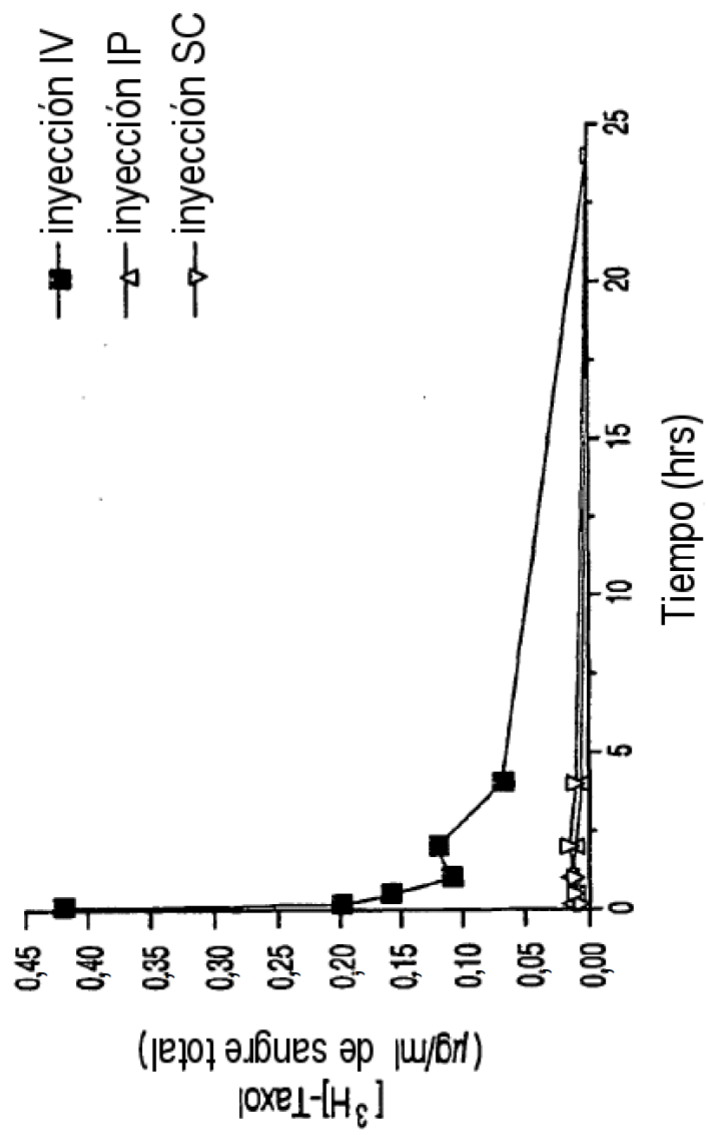


FIG-19B

Cinética de Taxol en sangre

**FIG-19C**

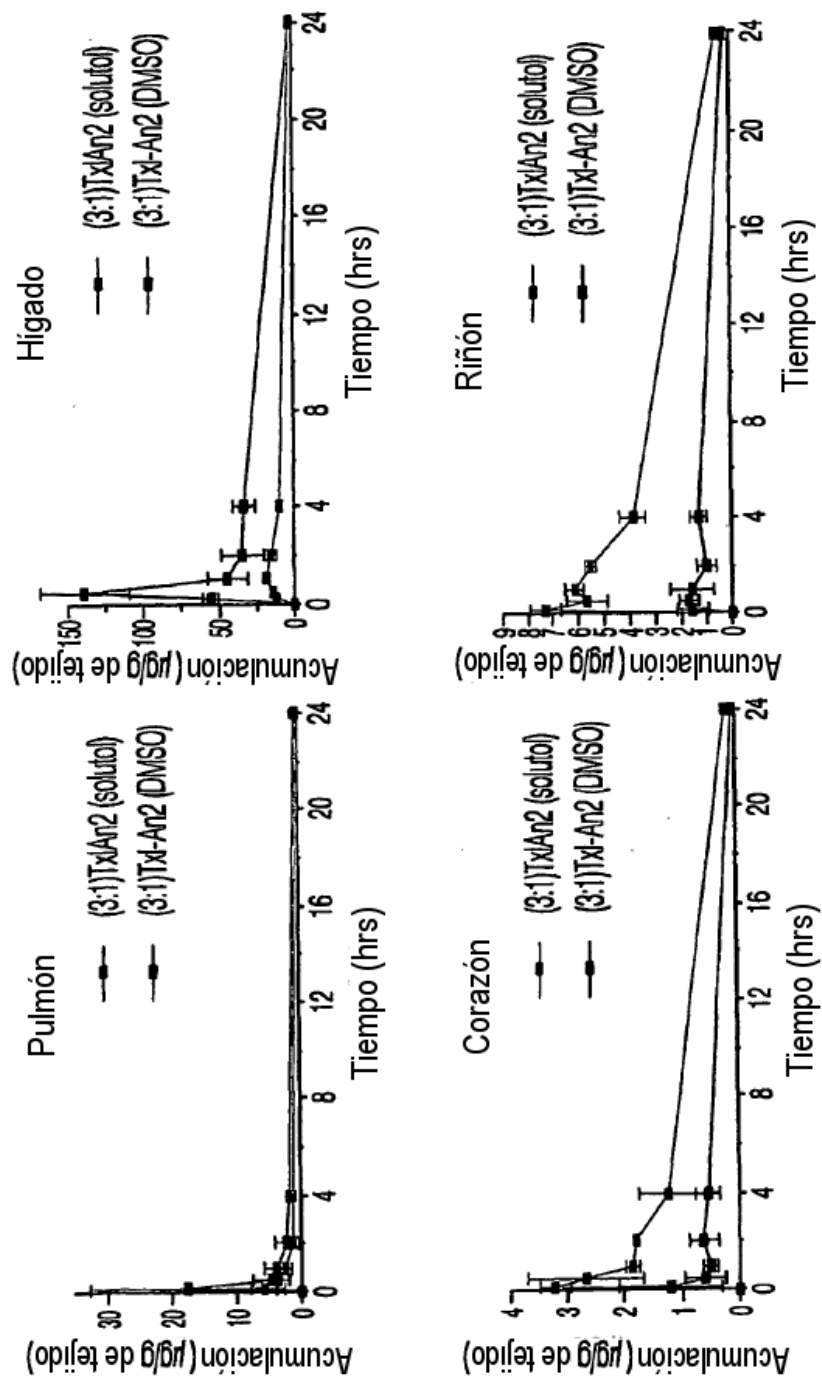


FIG-20A

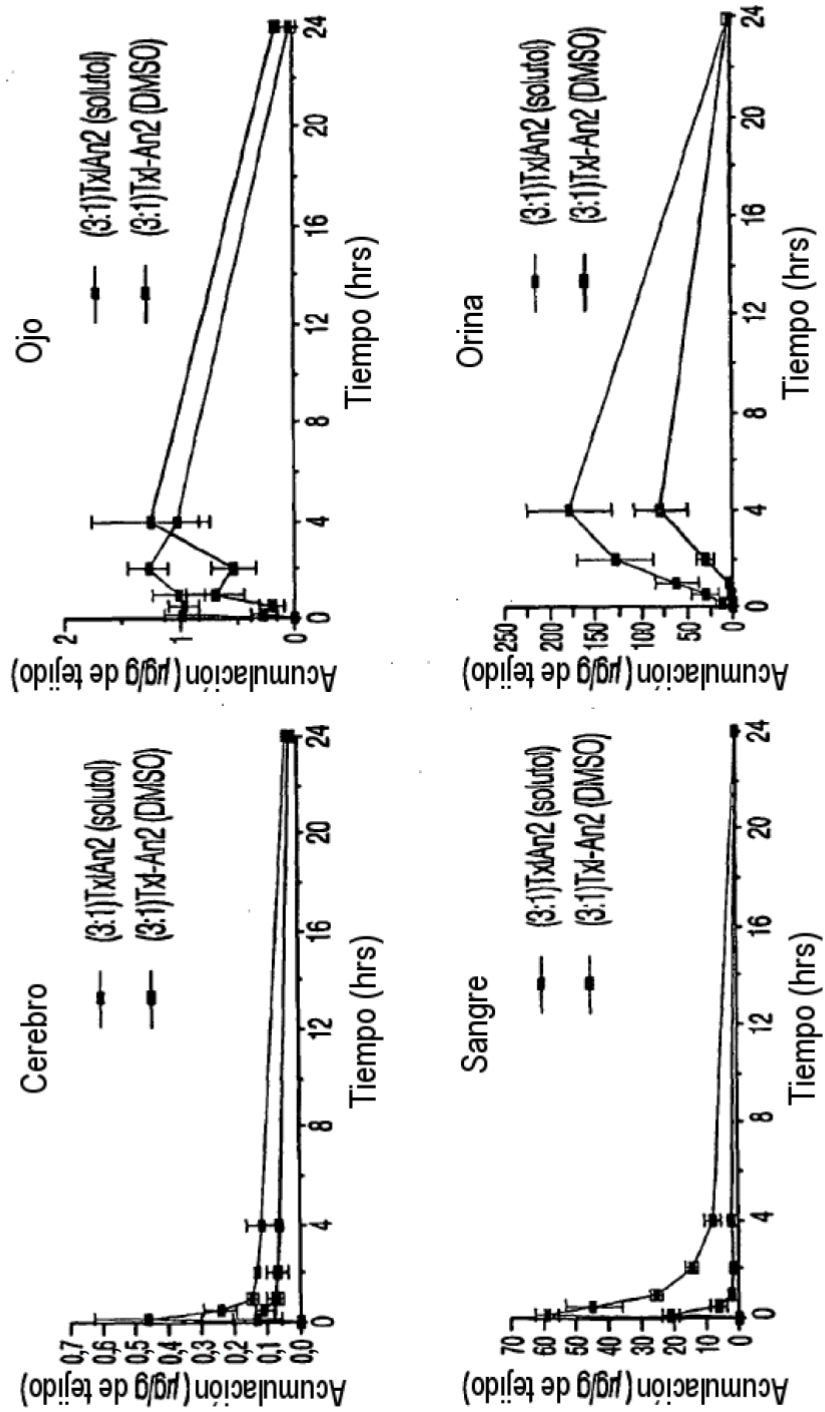


FIG-20B

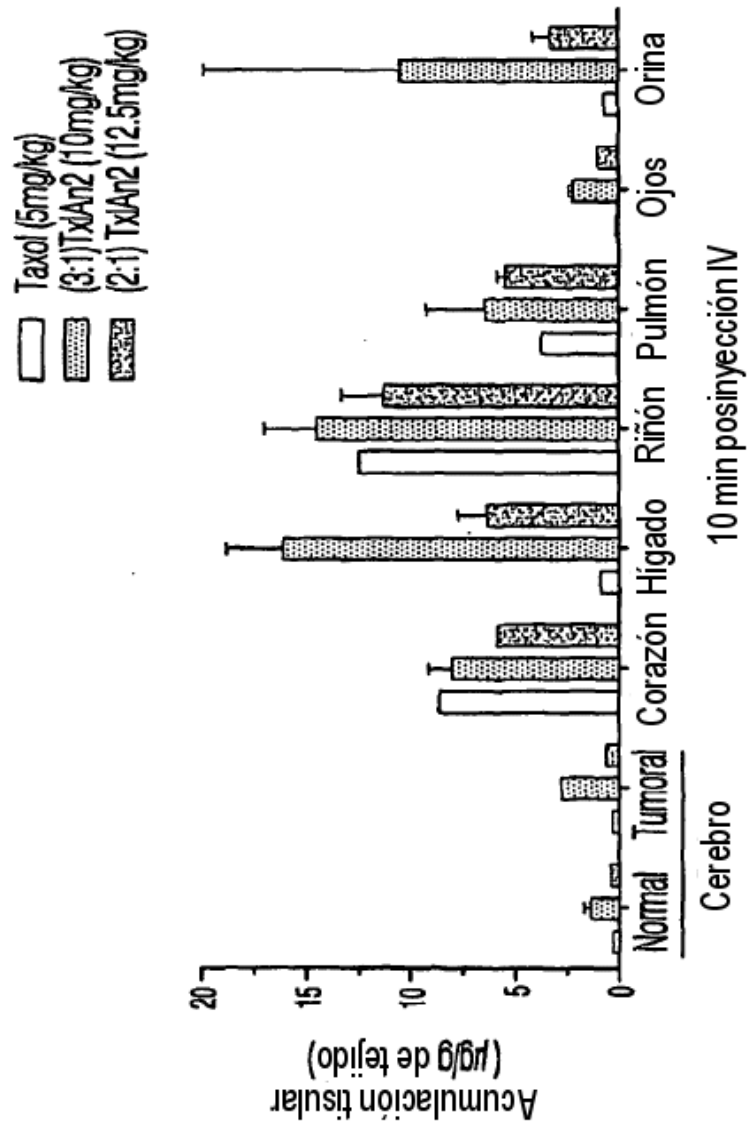


FIG-21A

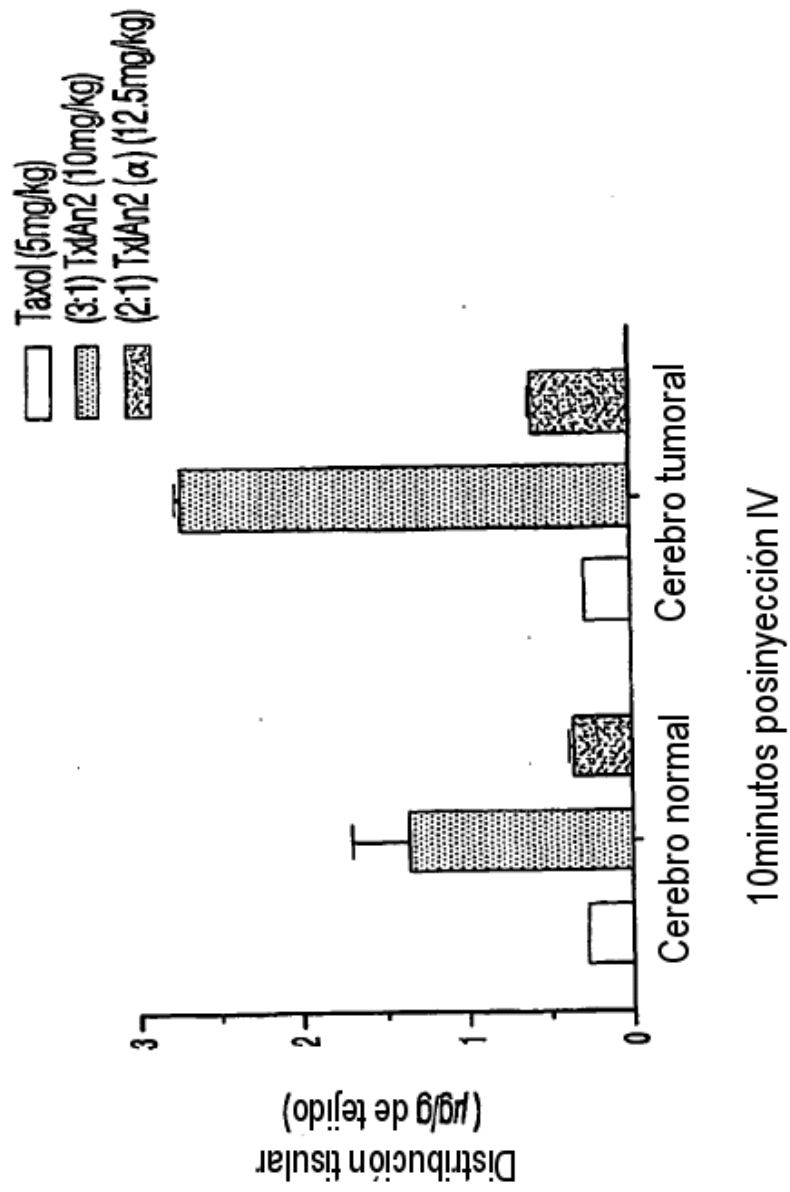


Fig. 21B

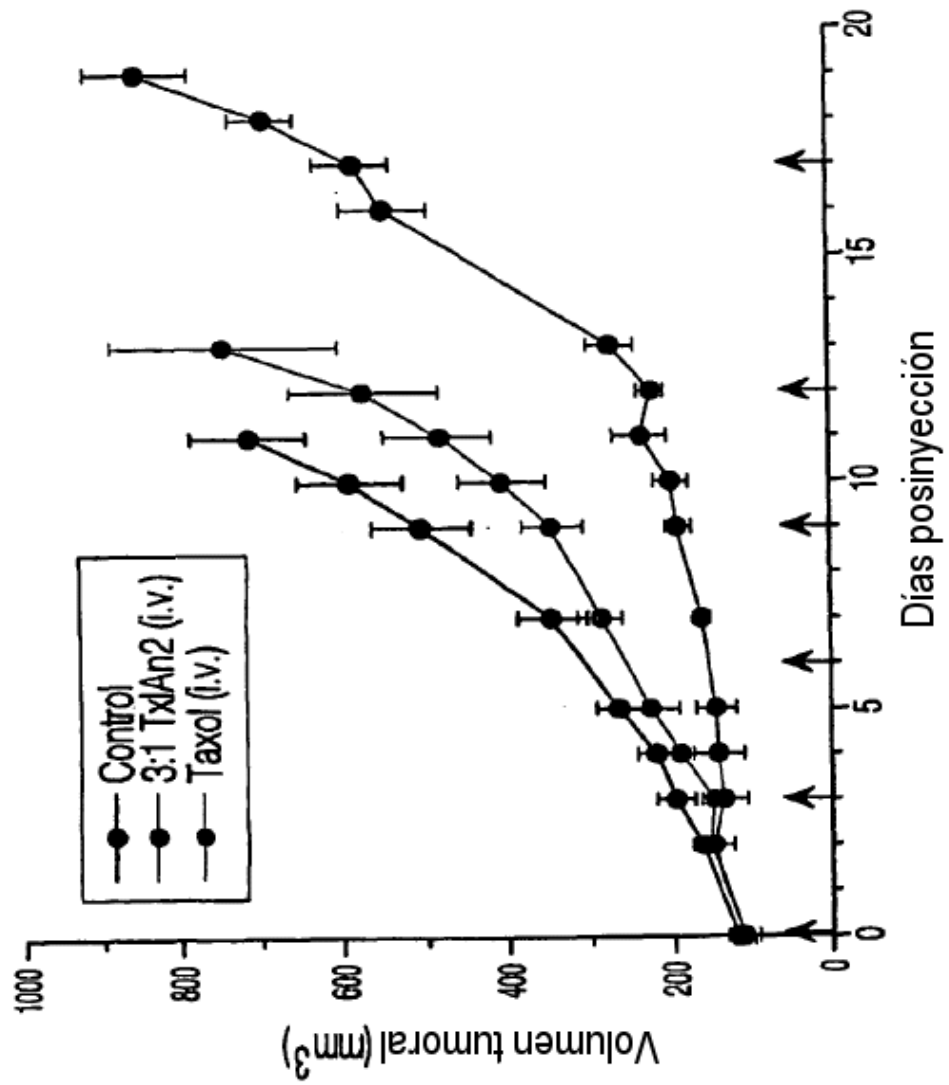


Fig. 22A

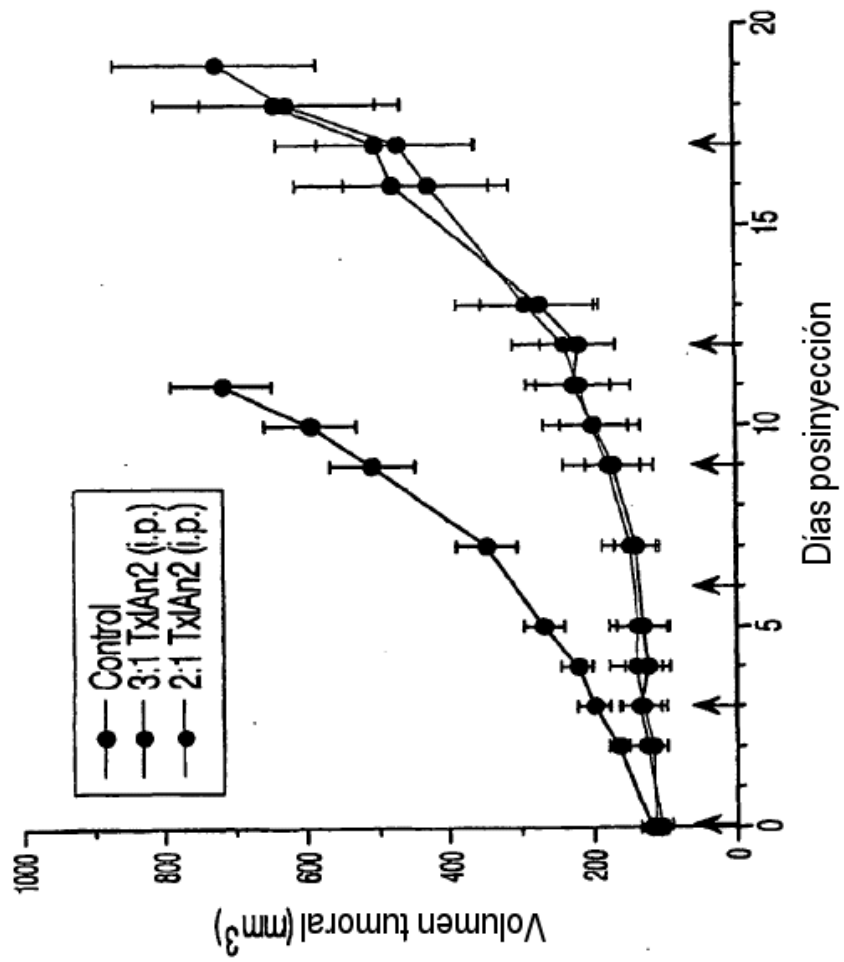


Fig-22B

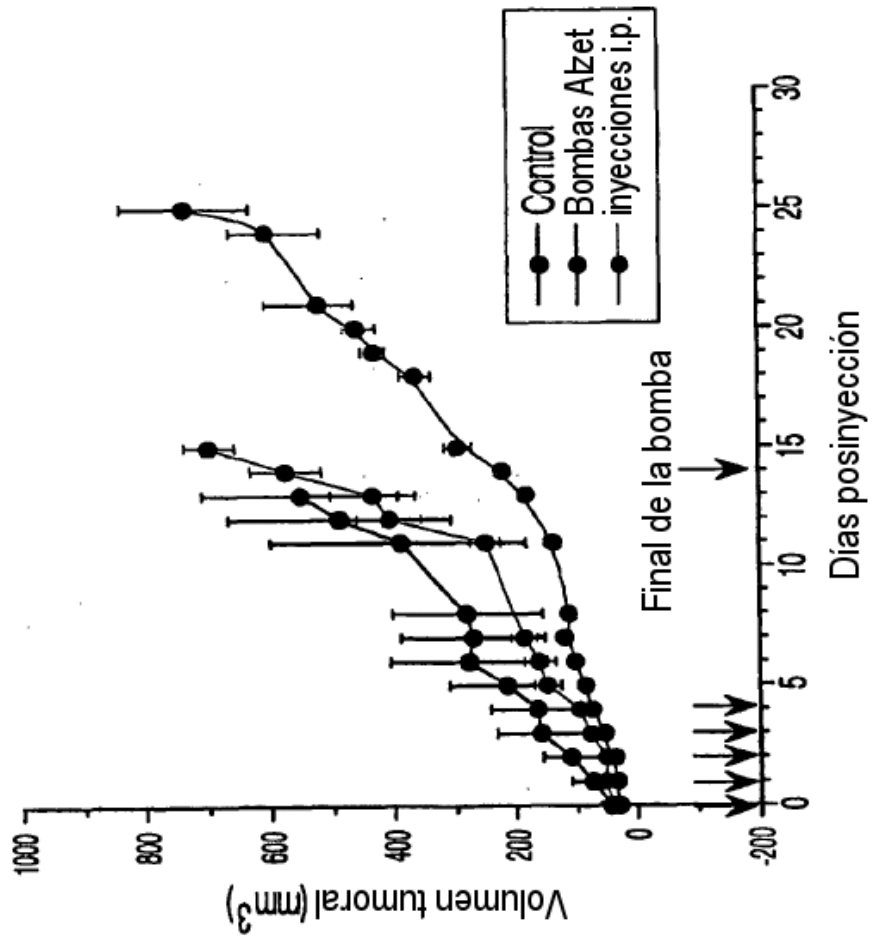


Fig-23A

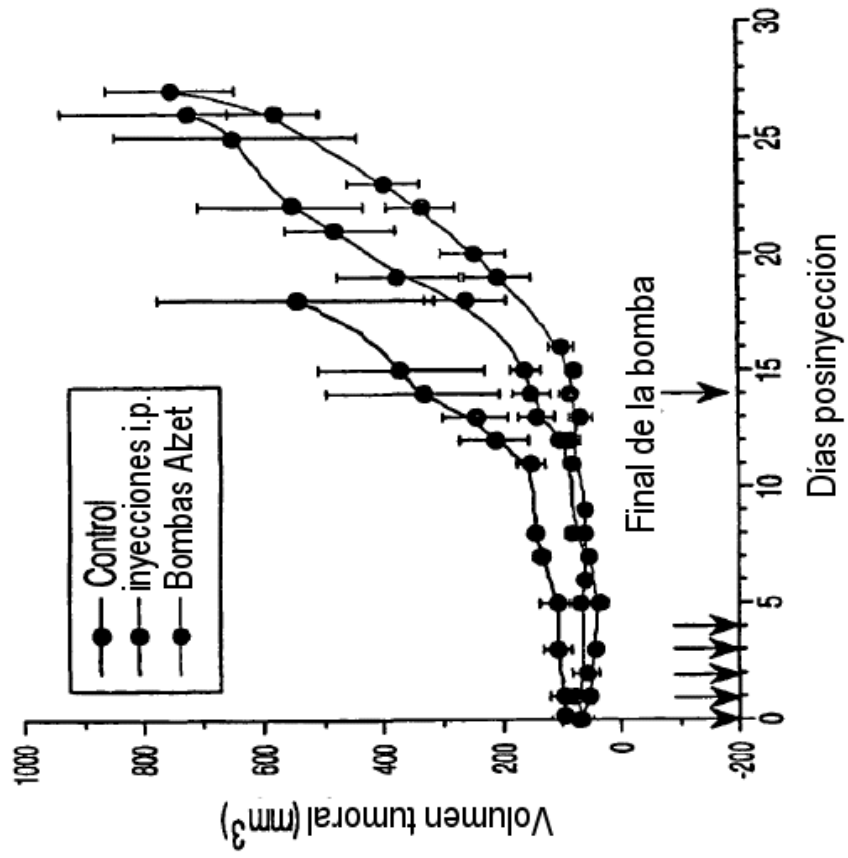


Fig. 23B