(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 779 992**

(51) Int. CI.:

A61K 47/64 (2007.01)
A61K 49/08 (2006.01)
A61K 49/14 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2006 PCT/US2006/048572**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2007 WO07073486**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2006 E 06848713 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 1971355**

(54) Título: **Métodos y composiciones para suministrar agentes activos con propiedades farmacológicas potenciadas**

(30) Prioridad:

20.12.2005 US 751896 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.08.2020

(73) Titular/es:

DUKE UNIVERSITY (100.0%)
Office of Science and Technology 3100 Tower Boulevard, 13th floor, Suite 1340
Durham NC 27707, US

(72) Inventor/es:

CHILKOTI, ASHUTOSH

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

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

Métodos y composiciones para suministrar agentes activos con propiedades farmacológicas potenciadas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a formulaciones para mejorar las propiedades farmacológicas de los agentes activos que se suministrarán a un sujeto.

Antecedentes de la invención

Un problema significativo con muchos fármacos candidatos, o incluso fármacos en uso clínico, es la eficacia in vivo insuficiente o insatisfactoria. La eficacia in vivo insuficiente puede manifestarse en una variedad de formas, tales como (i) baja biodisponibilidad del compuesto activo; (ii) vida media indeseablemente corta del compuesto activo, (iii) y/o toxicidad sistémica indeseablemente alta del compuesto activo. Para evitar la eliminación de fármacos de otro modo prometedores del uso clínico, sigue existiendo la necesidad de nuevas metodologías para potenciar la eficacia in vivo de los compuestos activos en su suministro a sujetos humanos y animales.

La Patente U.S. No. 6,004,782 de Danielle et al. describe polipéptidos bioelásticos y la expresión de los mismos en células huésped. El uso de los mismos como proteínas de fusión que contienen agentes terapéuticos se describe de manera superficial en la columna 15, líneas 43-53 de la misma. No se sugiere ni describe potenciar la eficacia in vivo de un agente activo.

La Patente U.S. No. 6,582,926 de Chilkoti describe, entre otras cosas, métodos para direccionar compuestos a regiones de interés en un sujeto mediante la administración del compuesto que va a ser suministrado como un conjugado con un polímero que experimenta una transición de temperatura inversa (tal como un ELP). Los compuestos que se suministrarán incluyen ciertos radionúclidos, agentes quimioterapéuticos, agentes citotóxicos y agentes de formación de imágenes como se establece en la columna 11, líneas 6-21. No se sugiere ni describe potenciar la eficacia in vivo de un agente activo.

La Patente U.S. No. 6,852,834 de Chilkoti describe, entre otras cosas, proteínas de fusión que son aislables por transición de fase, principalmente para mejorar el rendimiento de las mismas durante la fabricación. Las proteínas de fusión de proteínas terapéuticas se describen generalmente en la columna 11, líneas 10-24. No se sugiere ni describe potenciar la eficacia in vivo de un agente activo.

El documento US2004/234609 proporciona conjugados biomoleculares que comprenden el producto de conjugación de un polímero de proteína de secuencia repetida y al menos un agente activo. El documento US2003/059840 describe bioelastómeros para uso en métodos de unión de compuestos y en métodos para direccionar el suministro a una ubicación particular en un sujeto animal. El documento WO2007/002362 divulga potenciar la biodisponibilidad y la eficacia del péptido intestinal vasoactivo (VIP) mediante el uso de liposomas.

Resumen de la invención

Se proporciona una formulación farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un agente terapéutico conjugado con un péptido similar a la elastina (ELP), en el que la eficacia in vivo del agente terapéutico se potencia en comparación con la eficacia terapéutica en una forma no conjugada, y en donde el agente terapéutico es el péptido intestinal vasoactivo (VIP).

La eficacia in vivo puede potenciarse de una o más de las siguientes maneras: solubilidad, biodisponibilidad, dosis terapéutica efectiva, compatibilidad de formulación, resistencia a la proteólisis, semivida del agente terapéutico activo del péptido administrado, persistencia en el cuerpo posterior a la administración y tasa de depuración del organismo posterior a la administración.

La eficacia in vivo de dicho agente activo se potencia en dicho sujeto cuando dicho agente activo se administra a dicho sujeto en forma conjugada como dicho conjugado en comparación con la misma cantidad de dicho agente activo administrado a dicho sujeto en forma no conjugada. En algunas realizaciones, al menos uno de: (i) la biodisponibilidad de dicho agente activo es mayor; (ii) la vida media de dicho agente activo es mayor, (iii) la toxicidad sistémica de dicho agente activo es menor, en dicho sujeto cuando dicho agente activo se administra a dicho sujeto en forma conjugada como dicho conjugado en comparación con la misma cantidad de dicho agente activo administrada a dicho sujeto de la misma manera (por ejemplo, la misma dosis de agente activo, administrada en el mismo vehículo o composición portadora, por la misma ruta de administración) en forma no conjugada.

El conjugado se administra generalmente al sujeto en una cantidad efectiva para el tratamiento por cualquier ruta adecuada, tal como inyección parenteral.

La formulación farmacéutica puede comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los anteriores y otros objetos y aspectos de la invención se explican con mayor detalle en los dibujos de este documento y en la especificación que se expone a continuación.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. SDS-PAGE de una biblioteca de ELPs que se polimerizan a nivel génico, expresados en E. coli y purificados explotando la transición de fase de los ELPs.

Figura 2. Análisis SDS-PAGE de (A) ^{14}C-ELP visualizado por tinción de cobre, (B) autorradiografía ^{14}C-ELP después de SDS-PAGE. (C) El análisis farmacocinético de ^{14}C-ELP en ratones (Balb/c nu/nu) exhibe una distribución característica y una respuesta de eliminación con una vida media terminal de 8.4 horas.

Figura 3. Captación y localización de un ELP. Todas las imágenes son de células de carcinoma de células escamosas (FaDu) tomadas con un microscopio de fluorescencia confocal de barrido láser LSM-510. Las células se incuban con ELP-Alexa488 (verde) durante 1 hora antes de la cotinción. (A) Las células se tiñen con DiI-CM (rojo) para marcar la membrana celular. (B) Las células se cotiñen con rojo Lysotracker (rojo) que tiñe selectivamente los lisosomas. El ELP se colocaliza con el colorante rojo Lysotracker (nótese la fluorescencia amarilla).

Figura 4. (A) Síntesis de un derivado con una maleimida terminal: muestra que un derivado con una maleimida terminal se prepara uniendo un enlazador de hidrazona sensible al pH a Doxorubicina (en adelante como Dox), un agente quimioterapéutico contra el cáncer en la posición 13-ceto. Luego, la maleimida terminal del derivado se conjuga con un ELP, que presenta uno o más residuos de cisteína. (B) Es un ejemplo de citotoxicidad de Doxorrubicina conjugada con el conjugado ELP2-160JM2 (en lo sucesivo como ELP-Dox) en un ensayo de viabilidad celular MTT. La citotoxicidad de ELP-Doxorrubicina y Dox no conjugado es una función de la concentración equivalente de Doxorrubicina. En comparación con el fármaco libre, ELP-Doxorubicin demuestra una citotoxicidad casi equivalente de los fármacos libres. (C) ELP-Dox y Dox se inyectan a la misma concentración en ratones mediante inyecciones en la vena de la cola. Después de 1 h, no se puede detectar Dox en las muestras de sangre de los ratones. Sin embargo, se detectan ~20 gramos/g de suero inyectado (% ID/g) de los ratones inyectados con ELP-Dox. El resultado de este experimento demuestra que la forma conjugada tiene una semivida en plasma mayor del fármaco. (D) Demuestra la biodistribución de ratones lampiños inyectados con Dox y ELP-Dox con xenoinjertos de tumor humano. Tras la conjugación de Dox con ELP, se obtiene un patrón de distribución diferente. Las concentraciones de Dox en el corazón; el hígado y el pulmón son mayores que los de ELP-OPDX, sin embargo, la concentración de ELP-Dox en el tumor es mayor que la de Dox.

Figura 5. Acumulación de ELPs marcados con ^{14}C en tumores. Los dos ELPs informados son un ELP1 térmicamente sensible y un ELP2 térmicamente insensible en tumores que se calientan bien sea a 41.5 ºC o no se calientan.

Figura 6. Expresión de diferentes proteínas de fusión ELP como ejemplos de conjugados recombinantes ELP-proteína. Todos los conjugados ELP-proteína se preparan por fusión del gen de la proteína, ELP y expresión en un sistema de expresión heterógono (por ejemplo, E coli). El panel izquierdo muestra ejemplos de proteínas fluorescentes azules (BFP), cloranfenicol acetil transferasa (CAT) y dominios Kringle1-3 (K1-3: angiostatina). El panel derecho muestra otros ejemplos de conjugados de ELP-proteína purificados.

Figura 7. SDS-PAGE de purificación de la proteína de fusión ELP en la siguiente orientación: La preparación de la proteína-ELP y la proteína ELP muestra que los conjugados de proteínas de ELPs pueden sintetizarse en cualquier orientación. (A) CAT, (B) BFP, ©(C) Trx. (D) Cromatografía en capa fina que muestra la actividad de CAT, (D) Fluorescencia de BFP-ELP n ELP-BFP que muestra la funcionalidad de BDFP en la fusión.

Figura 8. (I) Caracterización de SDS-PAGE de purificaciones de transición inversa: muestra cada etapa de purificación para la fusión de tiorredoxina/90-mer ELP (49.9 kDa, carriles 1 a 5) Carril A: lisado soluble; carril B: sobrenadante desechado que contiene proteínas de E. coli contaminantes; carril 3: fracción de pella resolubilizada que contiene proteína de fusión purificada, carril 4, sobrenadante de segunda ronda; carril 5: pella de segunda ronda; carril 6: marcadores de peso molecular (kDa). (II) Actividad de proteína total (verde) y tiorredoxina (Trx) (rojo) para cada etapa de purificación de la ELP tioredoxina/90-mer. Los valores se normalizan a los determinados para el lisado soluble.

Figura 9. Ejemplos de síntesis de conjugados ELP-péptido. Todos los conjugados se preparan recombinantemente como fusiones con ELP. Los dos carriles en cada gel SDS-PAGE de A-F muestran la fusión (conjugado) a la izquierda y el péptido a la derecha. Los resultados de la espectrometría de masas para cada péptido purificado se muestran debajo de los geles SDS-PAGE. (A) Neuropéptido modulador de la morfina (MMN), (B) Neuropéptido Y (NPY), (C) Orexina B, (D) Leptina (E) ACTH, (F) Pro-calcitonina.

Figura 10. Ejemplos de conjugado ELP-péptido. Fusión recombinante del péptido antimicrobiano MSI-78 con ELP (conjugado ELP-péptido). Secuencia de MSI-78: Secuencia = GIGKFLKKAKKFGKAFVKILKK. (A) Purificación de ELP1-90-MSI-78 y MSI-78. El gel SDS-Page muestra tanto una alta pureza del conjugado como el péptido producido de forma recombinante. (B) Pureza del conjugado EP-MSI-78 determinado por cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas. Se detectó un compuesto con un peso molecular de 2476.6 y la pureza es> 99% por LC-ELSD (C) Actividad bactericida de MSI-78.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

El "agente activo" tal como se usa en el presente documento puede ser cualquier agente activo adecuado, incluidos los agentes terapéuticos y de diagnóstico o de generación de imágenes.

Ejemplos de agentes de generación de imágenes incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos (por ejemplo, ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{125}I, ^{131}I), marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), agentes de contraste de IRM (por ejemplo, Gadolinum quelatos (Gd)) etiquetas luminiscentes tales como luminol; etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, acetilcolinesterasa), grupos biotinilo (que pueden detectarse mediante avidina marcada, por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o calorimétricos), epítopos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopo). También se pueden emplear métodos indirectos en los que la reacción primaria antígeno-anticuerpo se amplifica mediante la introducción de un segundo anticuerpo.

El "agente terapéutico" como se usa en el presente documento puede ser cualquier agente terapéutico adecuado, que incluye pero no limitado a radionúclidos, agentes quimioterapéuticos, agentes citototóxicos, proteína relacionada con la hormona paratiroidea (proteína relacionada con la hormona paratiroidea), hormona del crecimiento (GH) particularmente hormona del crecimiento humana y bovina, hormonas liberadoras de la hormona del crecimiento; interferón que incluye interferones α-, β- o γ, etc., interleucina-I; interleucina-II; eritropoyetina que incluye eritropoyetina α- y β- (EPO), factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), proteínas anti-agiogénicas (por ejemplo, angiostatina, endostatina) polipéptido PACAP (polipéptido activador de adenilato ciclasa pituitaria), péptido intestinal vasoactivo (VIP), hormona liberadora de tirotropina (TRH), hormona liberadora de corticotrofina (CRH), vasopresina, arginina vasopresina (AVP), angiotensina, calcitonina, factor naturético atrial, somatostatina, adrenocorticotropina, hormona liberadora de gonadotropina, oxitocina, insulina, somatotropina, antígeno HBS del virus de la hepatitis B, activador de tejido plasminógeno, factores de coagulación que incluyen factores de coagulación VIII y IX, glucosilceramidasa, sargramostim, lenograstina, filgrastina, interleucina-2, dornasa-α, molgramostim, PEG-L-asparaginasa, PEG-adenosina desaminasa, hirudina, factores de crecimiento nervioso de eptacog-α (factor VIIa de coagulación de la sangre humana), factor de crecimiento transformante, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento básico de fibroblastos, VEGF; heparina incluyendo heparina de bajo peso molecular, calcitonina; factor naturético atrial; antígenos; anticuerpos monoclonales; somatostatina; adrenocorticotropina, hormona liberadora de gonadotropina; oxitocina; vasopresina; cromolyn sodio; vancomicina; desferrioxamina (DFO); hormona paratiroidea, antimicrobianos, antifúngicos, un inmunógeno o antígeno, un anticuerpo tal como un anticuerpo monoclonal, o cualquier combinación de los mismos. Véanse, por ejemplo, las patentes US Nos. 6,967,028; 6,930,090; y 6,972,300.

Los agentes terapéuticos de ejemplo incluyen todos los agentes terapéuticos establecidos en los párrafos 0065 a 0388 de W. Hunter, D. Gravett, et al., Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 20050181977 (publicada el 18 de agosto de 2005) (asignada a Angiotech International AG) cuya divulgación se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

El "radionúclido" como se describe en el presente documento puede ser cualquier radionúclido adecuado para suministrar una dosificación terapéutica de radiación a una célula tumoral o cancerosa, que incluye pero no se limita a ^{227}Ac, ^{211}At, ^{131}Ba, ^{77}Br, ^{109}Cd, ^{51}Cr, ^{67}Cu, ^{165}Dy, ^{155}Eu, ^{153}Gd, ^{198}Au, ^{166}Ho, ^{113m}In, ^{115m}In, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{189}Ir, ^{191}Ir, ^{192}Ir, ^{194}Ir, ^{52}Fe, ^{55}Fe, ^{59}Fe, ^{177}Lu, ^{109}Pd, ^{32}P, ^{226}Ra, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{46}Sc, ^{47}Sc, ^{72}Se, ^{75}Se, ^{105}Ag, ^{89}Sr, ^{35}S, ^{177}Ta, ^{117}mSn, ^{121}Sn, ^{166}Yb, ^{169}Yb, ^{90}Y, ^{212}Bi, ^{119}Sb, ^{197}Hg, ^{97}Ru, ^{100}Pd, ^{101m}Rh, y ^{212}Pb. Los radionúclidos también pueden ser aquellos útiles para administrar una dosificación detectable con fines de diagnóstico por generación de imágenes o diagnóstico, incluso cuando esos compuestos no son útiles con fines terapéuticos.

El "agente quimioterapéutico" tal como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a metotrexato, daunomicina, mitomicina, cisplatino (cisplatino o cis-diamminodicloroplatino (II) (CCDP)), vincristina, epirubicina, fluorouracilo, verapamilo, ciclofosfamida, citosina arabinósido, aminopinina, aminostina, aminostina, aminostina , mitomicina C, democolcina, etopósido, mitramicina, clorambucil, melfalan, daunorrubicina, doxorrubicina, tamoxifeno, paclitaxel, vincristina, vinblastina, camptotecina, actinomicina D y citarabina, combrestatina y sus derivados.

El "agente citotóxico" tal como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, ricina (o más particularmente la cadena de ricina A), aclacinomicina, toxina diftérica. Monensina, Verrucarina A, Abrina, Alcaloides de la Vinca, Tricotecenos y Pseudomonas exotoxina A.

"Inmunógeno" y "antígeno" se usan de forma intercambiable y significa cualquier compuesto al que una respuesta inmune celular o humoral es para ser dirigido en contra, e incluyen antígenos bacterianos, antígenos virales y antígenos tumorales. Actualmente se prefieren los inmunógenos no vivos (por ejemplo, inmunógenos muertos, vacunas de subunidades, proteínas recombinantes o péptidos o similares). Ejemplos de inmunógenos adecuados incluyen los derivados de polisacáridos de superficie bacteriana que pueden usarse en vacunas basadas en carbohidratos. Las bacterias típicamente expresan carbohidratos en su superficie celular como parte de glucoproteínas, glucolípidos, cadenas laterales específicas de O de lipopolisacáridos, polisacáridos capsulares y similares. Las cepas bacterianas de ejemplo incluyen Streptococcus pneumonia, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenza, Klebsiella spp., Pseudomonas spp., Salmonella spp., Shigella spp. y estreptococos del grupo B. En la técnica se describe un número de epítopos de carbohidratos bacterianos adecuados que pueden usarse como inmunógeno

(por ejemplo, Sanders, et al. Pediatr. Res. 37:812-819 (1995); Bartoloni, et al. Vaccine 13:463-470 (1995); Pirofski, et al., Infect. Immun. 63:2906-2911 (1995) y Publicación Internacional No. WO 93/21948) y se describen adicionalmente en la Patente US No. 6,413,935. El antígeno viral o inmunógeno de ejemplo incluye los derivados del VIH (por ejemplo, gp120, nef, tat, pol). Ejemplos de antígenos fúngicos incluyen aquellos derivados de Candida albicans, Cryptococcus neoformans, Coccidoides spp., Histoplasma spp. y Aspergillus spp. Los antígenos parasitarios incluyen los derivados de Plasmodium spp., Trypanosoma spp., Schistosoma spp., Leishmania spp. y similares. Los epítopos de carbohidratos de ejemplo que se pueden utilizar como antígenos o inmunógenos incluyen, pero no se limitan a los siguientes: Galα1,4Galβ- (para vacunas bacterianas); GalNAcα- (para vacunas contra el cáncer); Manβ1,2 $(Manβ)_n$Manβ- (para vacunas fúngicas útiles contra, por ejemplo, Candida albicans), donde n=O→ ∞; GalNAcβ1,4 (NeuAcα2,3)Galβ1,4Glcβ-O-ceramida. (para vacunas contra el cáncer); Galα1,2 (Tyvα1,3) Manα1,4Rhaα1,3Galα1,2 (Tyα1,3) Manα4Rha- y Galα1,2(Abeα1,3)Manα1,4Rhaα1,3Galα1,2(Abeα1,3)Manα1,4Rhaα1,3Galα1,2 (Abeα1,3)Manα1,4Rha-(los cuales son útiles contra, por ejemplo, Salmonella spp.). Los epítopos de carbohidratos como antígenos o inmunógenos y la síntesis de los mismos se describen adicionalmente en la Patente U.S. No. 6,413,935. En una realización, el inmunógeno puede ser un inmunógeno de ántrax; es decir, un inmunógeno que produce inmunidad protectora contra Bacillus anthracis, tal como la vacuna contra el ántrax, A, (Departamento de Salud de Michigan, Lansing, Mich.; descrito en la Patente U.S. No. 5,728,385). Otros ejemplos de inmunógenos o antígenos incluyen, pero no se limitan a, aquellos que producen una respuesta inmune o antigénica a las siguientes enfermedades y agentes causantes de enfermedades: adenovirus; Bordetella pertussus; Botulismo; rinotraqueitis bovina; Branhamella catarrhalis; hepatitis canina; moquillo canino; Clamidias; Cólera; coccidiomicosis; viruela, citomegalovirus; citomegalovirus; fiebre del Dengue; toxoplasmosis por dengue; Difteria; encefalitis; Escherichia coli enterotoxigénica; Virus de Epstein Barr; encefalitis equina; anemia infecciosa equina; gripe equina; neumonía equina; rinovirus equino; leucemia felina; flavivirus; Globulina; haemophilus influenza tipo b; Haemophilus influenzae; Haemophilus pertussis; Helicobacter pylori; Hemofilo; hepatitis; hepatitis A; hepatitis B; Hepatitis C; virus del herpes; VIH; Virus VIH-1; Virus VIH-2; HTLV; Influenza; encefalitis japonesa; Especies de Klebsiellae; Legionella pneumophila; leishmania; lepra; enfermedad de Lyme; inmunógeno de malaria; sarampión; meningitis; meningocócico; Polisacárido meningocócico grupo A; Polisacárido meningocócico Grupo C; paperas; Virus de las paperas; micobacterias y; Tuberculosis micobacteriana; Neisseria Neisseria gonorrhoeae; Neisseria meningitidis; lengua azul ovina; encefalitis ovina; papiloma; parainfluenza; paramixovirus; paramixovirus; Tos ferina; Plaga; Neumococo; Pneumocystis carinii; Neumonía; Poliovirus; Especies de Proteus; Pseudomonas aeruginosa; rabia; virus sincitial respiratorio; rotavirus; Rubéola; Salmonellae; esquistosomiasis; Shigellae; virus de inmunodeficiencia de simio; Viruela; Staphylococcus aureus; Especies de estafilococos; Steotococos neumonia; Streptococcus pyogenes; Especies de Streptococcus; gripe porcina; tétanos; Treponema pallidum; Tifoidea; Vacuna; virus de la varicela zoster; y Vibrio cholerae. Los antígenos o inmunógenos pueden incluir diversos toxoides, antígenos virales y/o antígenos bacterianos tales como antígenos de antígenos comúnmente empleados en las siguientes vacunas: vacuna contra la varicela; vacunas contra la difteria, el tétanos y la tos ferina; vacuna contra haemophilus influenzae tipo b (Hib); vacuna contra la hepatitis A; vacuna contra la hepatitis B; vacuna contra la influenza; vacunas contra el sarampión, las paperas y la rubéola (MMR); vacuna neumocócica; vacunas contra la polio; vacuna contra rotavirus; vacunas contra el ántrax; y vacuna contra el tétanos y la difteria (Td). Véase, por ejemplo, la Patente U.S. No. 6,309,633. Los antígenos o inmunógenos que se usan en el presente documento incluyen aquellos que se derivan o modifican de alguna manera, tal como conjugando o acoplando uno o más grupos adicionales a los mismos para mejorar la función o lograr funciones adicionales tales como el direccionamiento o el suministro potenciado de los mismos, que incluyen pero no se limitan a aquellas técnicas descritas en la Patente U.S. No. 6,493,402 de Pizzo et al. (complejos de macroglobulina α-2); Patente U.S. No. 6,309,633; Patente U.S. No. 6,207,157; Patente U.S. No. 5,908,629, etc.

El interferón (IFNs) que se usa en el presente documento se refiere a proteínas naturales producidas por las células del sistema inmunitario de la mayoría de los vertebrados en respuesta a los desafíos de agentes extraños tales como virus, bacterias, parásitos y células tumorales, y su función es inhibir la replicación viral dentro de otras células. Los interferones pertenecen a la gran clase de glicoproteínas conocidas como citocinas. Se han descubierto tres clases principales de interferones para humanos como tipo I, tipo II y tipo III, clasificadas de acuerdo con el tipo de receptor a través del cual señalan. Los IFNs de tipo I humanos comprenden un vasto y creciente grupo de proteínas IFN, denominadas IFN-α, IFN-β, IFN-κ, IFN-δ, IFN-ε, IFN-τ, IFN-ω e IFN-ζ. [Véase Interferon-ζ/limitin: Novel type I Interferon that displays a narrow range of biological activity, Oritani Kenji and Tomiyama Yoshiaki, International Journal of hematology, 2004, 80, 325-331; Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes, Hardy et al., Genomics, 2004, 84, 331-345.] Se encuentran moléculas homólogas a IFN tipo I en muchas especies, incluida la mayoría de los mamíferos, y algunas han sido identificadas en aves, reptiles, anfibios y especies de peces. [Véase The interferon system of non-mammalian vertebrates, Schultz et al., Developmental and Comparative Immunology, 28, 499-508.] Todos los IFNs tipo I se unen a un complejo receptor de superficie celular específico conocido como receptor IFN-α (IFNAR) que consiste en cadenas IFNAR1 e IFNAR2. Los IFNs de tipo II solo tienen un miembro llamado IFN-γ. El IFN-γ maduro es un homodímero antiparalelo, que se une al complejo del receptor de IFN-γ (IFNGR) para provocar una señal dentro de su célula objetivo. El grupo IFN tipo III consta de tres moléculas de IFN-λ llamadas IFN-λ1, IFN-λ2 e IFN-λ3 (también llamadas IL29, IL28A e IL28B respectivamente). [Véase Novel interferons, Jan Vilcek, Nature Immunology, 2003, 4, 8-9.] Las moléculas IFN- λ señalan a través de un complejo receptor que consiste en IL10R2 (también llamado CRF2-4) e IFNLR1 (también llamado CRF2-12). [Véase Murine interferon lambdas (type III interferons) exhibit potent antiviral activity in vivo in a poxvirus infection model, Bartlett et al., Journal of General Virology, 2005, 86, 1589-1596.]

"Anticuerpo" o "anticuerpos" como se usa en el presente documento se refiere a todos los tipos de inmunoglobulinas, incluyendo IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. El término "inmunoglobulina" incluye los subtipos de estas inmunoglobulinas, tales como IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, etc. De estas inmunoglobulinas, se prefieren IgM e IgG, y se prefiere particularmente la IgG. Los anticuerpos pueden ser de cualquier especie de origen, incluidos (por ejemplo) ratones, ratas, conejos, caballos o humanos, o pueden ser anticuerpos humanizados o quiméricos. El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento incluye fragmentos de anticuerpos que retienen la capacidad de unirse a un antígeno diana, por ejemplo, fragmentos Fab, $F(ab')_2$ y Fv, y los fragmentos correspondientes obtenidos de anticuerpos distintos de IgG. Tales fragmentos también se producen mediante técnicas conocidas. Los anticuerpos pueden ser para fines de diagnóstico o para fines terapéuticos. Ejemplos de anticuerpos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a herceptin, rituxan, campath (Mellinium pharma Inc.), gemtuzumab (Cell tech.), Herceptin (Genentech), panorex (Centocor GSK), rituximab (Genentech), bexxar (Coraxia GSK), edrecolomab (Glaxo-wellcome), alemtuzumab (ILEX Pharmaceuticals), mylotrag (Whety-Ayerst), IMC-C225, smartin 195 y mitomomab (sistemas Imclone). Los anticuerpos terapéuticos incluyen aquellos acoplados a un compuesto terapéutico y anticuerpos de "dosis fría", tales como para reducir la unión no específica. Véase, por ejemplo, Abrams et al., Patente U.S. No. RE38,008.

"Tratar" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier tipo de tratamiento o prevención que imparta un beneficio a un sujeto afectado por una enfermedad o en riesgo de desarrollar la enfermedad, incluida la mejora de la condición del sujeto (por ejemplo, en uno o más síntomas) , retrasar la progresión de la enfermedad, retrasar la aparición de los síntomas o ralentizar la progresión de los síntomas, etc. Como tal, el término "tratamiento" también incluye el tratamiento profiláctico del sujeto para prevenir la aparición de los síntomas. Como se usa en el presente documento, "tratamiento" y "prevención" no necesariamente significan curar o abolir completamente los síntomas "para cualquier tipo de tratamiento que imparta un beneficio a un paciente afectado por una enfermedad, incluida la mejora de la condición del paciente (por ejemplo, en uno o más síntomas), retraso en la progresión de la enfermedad, etc.

"Cantidad efectiva de tratamiento", como se usa en el presente documento, significa una cantidad del anticuerpo suficiente para producir un efecto deseable sobre un paciente infligido con una afección tal como cáncer, diabetes, infección bacteriana o viral, etc., que incluye una mejora en la afección del paciente (por ejemplo, en uno o más síntomas), retraso en la progresión de la enfermedad, etc. Con un inmunógeno, una "cantidad efectiva del tratamiento" puede ser una cantidad efectiva para producir una respuesta inmune o inmunidad protectora (total o parcial) contra la subsiguiente infección por un agente bacteriano, viral, fúngico, protozoario u otro agente microbiano.

"Conjugado" como se usa en el presente documento se refiere a dos o más unidades estructurales o grupos funcionales que están unidos covalentemente o no covalentemente entre sí, de tal manera que los dos o más grupos funcionan juntos como una estructura única bajo las condiciones de los métodos descritos en el presente documento. En una realización, el conjugado es una proteína de fusión. En algunas realizaciones, el conjugado se refiere a las dos unidades estructurales que están unidas química o enzimáticamente entre sí.

La "proteína de fusión", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína o péptido, producido por medios recombinantes (es decir, expresión de un ácido nucleico) que está compuesto por una primera proteína o péptido unido covalentemente en la expresión a una segunda proteína o péptido.

Un "polímero que experimenta una transición de temperatura inversa" en el presente documento se refiere a un polímero que es soluble en una solución acuosa a una temperatura más baja, y es insoluble en una solución acuosa a una temperatura más alta.

"Temperatura de transición" o "T_t", como se usa en el presente documento, se refiere a la temperatura por encima de la cual un polímero que experimenta una transición de temperatura inversa es insoluble en un sistema acuoso (por ejemplo, agua, solución salina fisiológica), y por debajo del cual dicho polímero es soluble en un sistema acuoso.

Un "polímero bioelástico" es, en general, un polipéptido que exhibe una transición de temperatura inversa. Los polímeros bioelásticos se analizan con mayor detalle a continuación. Tales polímeros bioelásticos son típicamente péptidos similares a elastina.

Si bien la presente invención puede usarse en el tratamiento de sujetos humanos, la invención también puede usarse para el tratamiento de sujetos animales, particularmente sujetos mamíferos tales como perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, etc., con fines veterinarios.

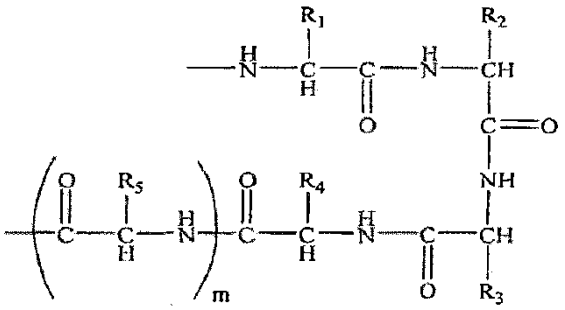
Tales sujetos incluyen sujetos afectados por cualquier trastorno convencional o actualmente tratado o diagnosticado por los agentes activos descritos en este documento, incluidos, pero no limitados a sujetos afectados por tumores sólidos o cánceres tales como pulmón, colon, mama, cerebro, hígado, próstata, bazo, músculo; ovario, páncreas, piel (incluido melanoma), etc., sujetos afectados o en riesgo de desarrollar una infección viral, bacteriana, protozoaria u otra infección microbiana; etc.

Polímeros bioelásticos. Los polímeros bioelásticos se conocen y describen en, por ejemplo, la patente US No. 5,520,672 de Urry et al. En general, los polímeros bioelásticos son polipéptidos que comprenden unidades elastoméricas de pentapéptidos, tetrapéptidos y/o no péptidos bioelásticos (es decir, "péptidos similares a elastina"). Así, en algunas realizaciones, la unidad elastomérica es un pentapéptido, en otras realizaciones la unidad elastomérica es un tetrapéptido, y en todavía otras realizaciones, la unidad elastomérica es un no péptido. Los polímeros

bioelásticos que pueden usarse se establecen en la patente U.S. No. 4,474,851, que describe un número de unidades repetitivas de tetrapéptidos y pentapéptidos que pueden usarse para formar un polímero bioelástico. Los polímeros bioelásticos específicos que pueden usarse para llevar a cabo la presente invención también se describen en las patentes U.S. Nos. 4,132,746; 4,187,852; 4,500,700; 4,589,882; y 4,870,055. Todavía otros ejemplos de polímeros bioelásticos se exponen en la Patente U.S. No. 6,699,294 de Urry, la Patente U.S. No. 6,753,311 de Fertala and Ko; y la Patente U.S. No. 6,063,061 de Wallace.

En una realización, los polímeros bioelásticos utilizados son polipéptidos de fórmula general $(VPGXG)_m$ donde X es cualquier aminoácido (por ejemplo, Ala, Leu, Phe) y m es cualquier número adecuado, tal como 2, 3 o 4 hasta 60, 80 o 100 o más. La frecuencia de los diversos aminoácidos como el cuarto aminoácido se puede cambiar, así como la frecuencia de X. Por ejemplo, los polímeros bioelásticos utilizados pueden ser polipéptidos de fórmula general: $[(VPGXG)_m\ (VPGKG)_n]_o$, donde m es 2, 3 o 4 a 20 o 30, n es 1, 2 o 3, o es al menos 2, 3 o 4 hasta 30, 40 o 50 o más. Cualquier relación de X/K puede ser posible, lo que significa que m es 1, 2 o 3 hasta 100, 150 o 300 o más, n es 1, 2 o 3 hasta 100 o 150 o 300 o más, o es al menos 1, 2 o 3 hasta 100, 150 o 300 o más.

Por ejemplo, los polímeros bioelásticos utilizados pueden comprender unidades elastoméricas repetitivas seleccionadas del grupo que consiste en pentapéptidos y tetrapéptidos bioelásticos, donde las unidades repetitivas comprenden residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en aminoácidos hidrófobos y residuos de glicina y donde las unidades repetitivas existen en una conformación que tiene un giro beta de la fórmula:



en donde R_1-R_5 representan cadenas laterales de los residuos de aminoácidos 1-5, y m es 0 cuando la unidad repetitiva es un tetrapéptido o 1 cuando la unidad repetitiva es un pentapéptido. Las unidades que se repiten sin péptidos generalmente consisten en tetra y pentapéptidos secuenciales. Los residuos de aminoácidos hidrófobos preferidos se seleccionan del grupo que consiste en alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. En muchos casos, el primer residuo de aminoácido de la unidad repetitiva es un residuo de valina, leucina, isoleucina o fenilalanina; el segundo residuo de aminoácido es un residuo de prolina; el tercer residuo de aminoácido es un residuo de glicina; y el cuarto residuo de aminoácido es glicina o un residuo muy hidrófobo tal como triptófano, fenilalanina o tirosina. Ejemplos particulares incluyen el tetrapéptido Val-Pro-Gly-Gly, el tetrapéptido GGVP, el tetrapéptido GGFP, el tetrapéptido GGAP, el pentapéptido es Val-Pro-Gly-Val-Gly, el pentapéptido GVGVP, el pentapéptido GKGVP, el pentapéptido GVGFP, el pentapéptido GFGFP, el pentapéptido GEGVP, el pentapéptido GFGVP y el pentapéptido GVGIP. Véase, por ejemplo, la Patente U.S. No. 6,699,294 de Urry.

El acoplamiento de conjugados puede realizarse por cualquier medio adecuado, incluidos medios químicos y recombinantes. El acoplamiento químico o enzimático puede llevarse a cabo mediante procedimientos conocidos en la técnica. (Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. Nos. 6,930,090; 6,913,903; 6,897,196; y 6,664,043). El acoplamiento de conjugados por medios recombinantes (por ejemplo, cuando la elastina se une a una proteína o péptido tal como una interleucina, por medios recombinantes tal como la expresión de una proteína de fusión) también puede llevarse a cabo mediante procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo , Patentes U.S. Nos. 6,974,572; 6,972,322; 6,962,978; y 6,956,112).

Formulaciones y administración. La administración del conjugado al sujeto puede llevarse a cabo por cualquier medio adecuado, tal como inyección subcutánea, inyección intraperitoneal, inyección intravenosa, inyección intramuscular, intratumoral, administración oral, administración por inhalación, administración transdérmica, etc. Las técnicas de administración preferidas son típicamente "sistémicas" en que una región particular de interés no está específicamente direccionada.

Los conjugados (o "compuestos activos") descritos anteriormente pueden formularse para administración en un único portador farmacéutico o en portadores farmacéuticos separados para el tratamiento de una variedad de afecciones. En la fabricación de una formulación farmacéutica, los compuestos activos que incluyen las sales fisiológicamente aceptables de los mismos, o los derivados ácidos de cualquiera de los mismos, típicamente se mezclan con, entre otros, un portador aceptable. El portador debe, por supuesto, ser aceptable en el sentido de ser compatible con cualquier otro ingrediente en la formulación y no debe ser perjudicial para el paciente. El portador puede ser un sólido o un líquido, o ambos, y se formula preferiblemente con el compuesto como una formulación de dosis unitaria, por ejemplo, una tableta, que puede contener del 0.5% al 95% en peso del compuesto activo. Se pueden incorporar uno o más compuestos activos en las formulaciones que se pueden preparar mediante cualquiera de las técnicas de

farmacia bien conocidas que consisten esencialmente en mezclar los componentes, incluyendo opcionalmente uno o más ingredientes accesorios.

Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para administración oral, rectal, tópica, bucal (por ejemplo, sublingual), parenteral (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intradérmica o intravenosa) y transdérmica, aunque la ruta más adecuada en cualquier caso dependerá de la naturaleza y la gravedad de la afección que se está tratando y la naturaleza del compuesto activo particular que se está utilizando.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden presentarse en unidades discretas, tales como cápsulas, sellos, pastillas o tabletas, conteniendo cada una de las cuales una cantidad predeterminada del compuesto activo; como polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión de aceite en agua o agua en aceite. Tales formulaciones pueden prepararse mediante cualquier método de farmacia adecuado, que incluye la etapa de unir el compuesto activo y un portador adecuado (que puede contener uno o más ingredientes accesorios como se indicó anteriormente). En general, las formulaciones se preparan mezclando uniforme e íntimamente el compuesto activo con un portador sólido líquido o finamente dividido, o ambos, y luego, si es necesario, conformando la mezcla resultante. Por ejemplo, una tableta puede prepararse comprimiendo o moldeando un polvo o gránulos que contienen el compuesto activo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Las tabletas comprimidas se pueden preparar comprimiendo, en una máquina adecuada, el compuesto en una forma que fluye libremente, tal como un polvo o gránulos opcionalmente mezclados con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte y/o agentes con actividad de superficie/dispersantes. Las tabletas moldeadas se pueden hacer moldeando, en una máquina adecuada, el compuesto en polvo humedecido con un aglutinante líquido inerte. Las formulaciones adecuadas para administración parenteral comprenden convenientemente preparaciones acuosas estériles del compuesto activo, cuyas preparaciones son preferiblemente isotónicas con la sangre del receptor deseado. Estas preparaciones pueden administrarse mediante inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular o intradérmica. Tales preparaciones pueden prepararse convenientemente mezclando el compuesto con agua o un regulador de glicina y haciendo que la solución resultante sea estéril e isotónica con la sangre.

Las formulaciones adecuadas para la administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos adaptados para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período prolongado de tiempo. Las formulaciones adecuadas para la administración transdérmica también pueden administrarse por iontoforesis (véase, por ejemplo, Pharmaceutical Research 3 (6): 318 (1986)) y típicamente toman la forma de una solución acuosa opcionalmente regulada del compuesto activo. Las formulaciones adecuadas comprenden citrato o regulador bis.backslash.tris (pH 6) o etanol/agua y contienen de 0.1 a 0,2 M de ingrediente activo. La dosificación terapéuticamente efectiva de cualquier agente activo variará un poco de un compuesto a otro, de un paciente a otro, y dependerá de factores tales como la condición del paciente y la ruta de suministro. Tales dosis se pueden determinar de acuerdo con los procedimientos farmacológicos de rutina conocidos por los expertos en la técnica, particularmente a la luz de la divulgación proporcionada en este documento. En un ejemplo; la dosificación es de 1 a 10 microgramos de compuesto activo por kilogramo de peso corporal del sujeto.

En otro ejemplo, donde el agente terapéutico es ^{131}I, la dosificación para el paciente es típicamente de 10 mCi a 100, 300 o incluso 500 mCi. Dicho de otra manera, cuando el agente terapéutico es ^{131}I, la dosificación para el paciente es típicamente de 5,000 Rads a 100,000 Rads (preferiblemente al menos 13,000 Rads, o incluso al menos 50,000 Rads). Las dosis para otros radionucleidos se seleccionan típicamente de tal manera que la dosis tumoralicida sea equivalente al rango anterior para ^{131}I.

En una realización preferida, las propiedades farmacológicas mejoradas se utilizan para mejorar el suministro y/o el régimen de dosificación al sujeto. Por ejemplo, se utiliza una vida media mejorada del agente activo para reducir la frecuencia de las dosificaciones al paciente (por ejemplo, una dosificación o administración cada tres o cuatro días; más preferiblemente una administración por semana, todavía más preferiblemente una administración cada dos semanas; todavía más preferiblemente una administración por mes); Se utiliza una biodisponibilidad mejorada para reducir la dosificación global del agente activo administrado al paciente, etc.

Ejemplos

El objetivo es suministrar selectivamente fármacos o agentes de generación de imágenes a los sitios enfermos para mejorar la eficacia terapéutica y limitar la toxicidad sistémica.

1. Portadores de fármacos o agentes de generación de imágenes: el portador es un novedoso portador de fármacos macromoleculares, que consiste en polipéptidos similares a la elastina (ELP). Los ELP pertenecen a una clase única de biopolímeros que experimentan una transición de fase de temperatura inversa; son solubles a temperaturas inferiores a su temperatura de transición (T_t) pero se vuelven insolubles y se agregan a temperaturas superiores a su T_t [1-3].

(i) El ELP puede diseñarse con una T_t que esté por debajo de la temperatura local en el sitio enfermo para que se agregue en el sitio enfermo.

(ii) Alternativamente, el ELP puede estar diseñado para tener una T_t que esté por encima del sitio enfermo para que permanezca en forma soluble.

(iii) El ELP puede contener sitios para la unión covalente o enzimática de fármacos o agentes de generación de imágenes o unidades estructurales de direccionamiento.

(iv) El ELP también puede diseñarse para contener unidades estructurales de direccionamiento genéticamente codificables (una o más) tales como un péptido o proteína para direccionar específicamente el ELP al sitio u órgano enfermo.

2. Definición de

(A) Fármaco: cualquier molécula que tenga valor terapéutico contra cualquier enfermedad.

(B) Agente generador de imágenes: cualquier molécula que proporcione visualización del sitio u órgano enfermo.

Ejemplo del fármaco o agente generador de imágenes incluiría, aunque no exclusivamente: (i) molécula pequeña, (ii) radionúclido, (iii) péptido (iv) peptidomimético, (v) proteína, (vi) oligonucleótido antisentido, (vii) ácido nucleico peptídico, (viii) ARNip, (ix) quelato de metal, (x) carbohidratos.

3. Adjunto o asociación de fármacos o agentes generadores de imágenes. El fármaco se puede enlazar covalentemente al ELP a través de un esquema de enlace estable o lábil. El fármaco puede estar hidrófobamente asociado con el ELP. El fármaco puede unirse al ELP mediante un método de quelación. El fármaco puede estar asociado con el ELP a través del reconocimiento molecular a través de uniones secundarias. El fármaco también puede unirse al ELP a través de la acción de una enzima. En el caso de moléculas tales como proteínas de péptidos que pueden producirse de forma recombinante, el ELP y el fármaco pueden producirse como una entidad única en un huésped adecuado (E. coli, pichia pastoris, células de mamífero o baculovirus) a partir de un gen sintético o clonado. El "conjugado de ELP-fármaco/agente generador de imágenes" puede sintetizarse de tal manera que el enlace entre el conjugado pueda ser estable para suministrar la entidad individual como agente terapéutico o generador de imágenes o diseñado para ser lábil bajo la acción del pH o la luz, o la acción de las enzimas para liberar el fármaco del ELP.

4. Administración: El conjugado de ELP-fármaco o proteína de fusión se: (i) inyectará en el sujeto por vía sistémica (iv, ia, ip o im) (ii) localmente en el sitio u órgano enfermo, (iii) o se suministrará por vía oral, o (iv) parenteralmente.

El conjugado de ELP-fármaco/agente generador de imágenes o proteína de fusión exhibirá en comparación con el fármaco libre uno o más de los siguientes: (1) solubilidad potenciada del fármaco/agente generador de imágenes en su forma conjugada sobre fármaco libre/agente generador de imágenes, mayor vida media de circulación, exhiben un aclaramiento reducido del cuerpo, o una biodisponibilidad incrementada del fármaco/agente generador de imágenes, lo que da como resultado una dosis y frecuencia de inyección reducidas, un índice terapéutico mejorado o una visualización mejorada del sitio u órgano enfermo.

Ejemplos:

Síntesis y caracterización de los ELPs. Los ELPs se preparan típicamente mediante una síntesis recombinante en E. coli. Sin embargo, también se pueden usar otros huéspedes para la síntesis recombinante. ELP también se puede preparar mediante una síntesis química. En un ejemplo típico de una síntesis recombinante, el proceso de polimerización se lleva a cabo a nivel genético mediante un método llamado ligadura direccional recursiva (RDL), en el que un gen sintético para una secuencia repetida para el ELP (que codifica típicamente ~10 pentapéptidos de VPGXG) se ligan de forma recíproca de cabeza a cola. Después de n rondas de ligadura en un plásmido, esto proporciona una biblioteca de n+1 genes ELP, todos los cuales codifican la misma secuencia de péptidos, pero con MWs que son múltiplos del fármaco.

Conjugación de ELP-fármaco. Un ELP que contiene un residuo de cisteína C-terminal único se sintetiza y purifica mediante ciclos de transición inversa (ITC) y se conjuga con moléculas de Doxorrubicina a través de cuatro enlazadores de hidrazona activados por maleimida y sensibles al pH. Las estructuras o la longitud de los enlazadores tienen poco efecto sobre la T_t de los conjugados ELP-Doxorubicina, ya que todas las T_ts de los conjugados son similares a las del ELP nativo (datos no mostrados). Sin embargo, los conjugados ELP-Doxorrubicina con conectores más largos exhiben una cinética de transición más lenta que los conjugados ELP-Doxorrubicina con enlazadores más cortos. A pH 4, la liberación de doxorrubicina del conjugado ELP-Doxorrubicina con el conector más corto alcanzó casi el 80% durante 72 h.

Citotoxicidad de los conjugados de ELP-doxorrubicina. Un conjugado de ELP-Doxorrubicina lábil a los ácidos se prueba para citotoxicidad en un ensayo de cultivo celular in vitro con células FaDu. El ELP no conjugado, el conjugado de control, no muestra ninguna citotoxicidad inherente, y por lo tanto indica que los ELP no son tóxicos a pesar de una internalización sustancial (Figura 4). Por el contrario, el conjugado ELP-Doxorrubicina muestra una citotoxicidad sustancial bien sea durante 24 o 72 h, y el nivel de toxicidad es similar al de una concentración equivalente de Doxorrubicina. Acumulación de ELPs en tumores sólidos. Los estudios de biodistribución se llevan a cabo mediante la inyección sistemática de ELP marcado con ^{14}C en ratones lampiños que portan un carcinoma sólido FaDu. La acumulación de los ELPs en tumores implantados está en el rango de 10-20% de dosis inyectada por gramo (% ID/g). Cuando un ELP con una T_t de ~40 ºC se inyecta sistemáticamente en un ratón y los tumores implantados se calientan

hasta 42 ºC, la acumulación es de ~ 20% ID/g. Por el contrario, cuando se inyecta el mismo ELP sin calentar los tumores, la acumulación fue de -10% ID/g. Estos datos muestran que hay una concentración significativa (% ID/g) del ELP radiomarcado localizado en el tumor incluso cuando el tumor no se calienta. Por el contrario, la inyección de una pequeña molécula radiomarcada (peso molecular <500 Da) en forma no conjugada da como resultado una acumulación significativamente menor en el tumor. Este ejemplo demuestra que los ELPs pueden dar como resultado una localización significativa en un sitio enfermo.

Tabla 1. Lista de conjugados de ELP-proteína sintetizados de forma recombinante (proteínas de fusión ELP), peso molecular (MW) de las proteínas diana y su rendimiento de un cultivo en matraz agitador de 1 litro de Escherichia coli.

Proteínas diana	MW (kDa)	Rendimiento (mg/L)
Angiostatina (K1-3)	30.7	27
Proteína fluorescente azul (BFP)	26.9	100
Calmodulina (CalM)	16.7	75
Cloranfenicol acetiltransferasa (CAT)	25.7	80
Proteína fluorescente verde (GFP)	26.9	78-1600
Antagonista del receptor de interleucina 1 (IL1rRa)	17.0	50
Luciferasa	60.8	10
Transglutaminasa tisular (tTg)	77.0	36
Tendamistat	7.9	22
Tiorredoxina (Trx)	11.7	120

Tabla 2. Rendimiento de conjugados péptido-ELP sintetizados recombinantemente en E. coli. Se muestra tanto el rendimiento del conjugado (fusión) como el péptido diana, así como la pureza determinada por espectrometría de masas.

Péptido	MW (kDa)	Fusión de rendimiento (mg/l de cultivo)	Péptido de rendimiento (mg/l de cultivo)	Pureza
Neuropéptido modulador de morfina (MMN)	2.0	224	17	99%
Neuropéptido Y (NPY)	2.7	222	20	98%
Orexina B	3.0	320	19	91%
Leptina	4.0	415	19	97%
ACTH	4.6	133	19	99%
Calcitonina	6.2	260	23	98%

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un agente terapéutico conjugado con un péptido similar a la elastina (ELP), en la que la eficacia in vivo del agente terapéutico se potencia en comparación con el agente terapéutico en una forma no conjugada, y en la que el agente terapéutico es el péptido intestinal vasoactivo (VIP).

2. La formulación de la reivindicación 1, en la que el agente terapéutico es una proteína de fusión con ELP.

3. La formulación de la reivindicación 2, en la que el agente terapéutico se potencia por su dosis terapéuticamente efectiva y/o vida media en circulación.

4. La formulación de la reivindicación 1, en la que el agente activo es soluble en la circulación.

5. La formulación de la reivindicación 4, en la que el ELP tiene una temperatura de transición de aproximadamente 40ºC en solución fisiológica.

6. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 formulada para administración sistémica.

7. La formulación de la reivindicación 6, formulada para inyección subcutánea, inyección intravenosa o inyección intramuscular.

8. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en un método para tratar a un sujeto mamífero que necesita tratamiento, comprendiendo el método administrar la formulación farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 al sujeto mamífero.

9. La formulación para uso de acuerdo con las reivindicaciones 8, en la que en el método la formulación farmacéutica se administra aproximadamente una vez por semana.

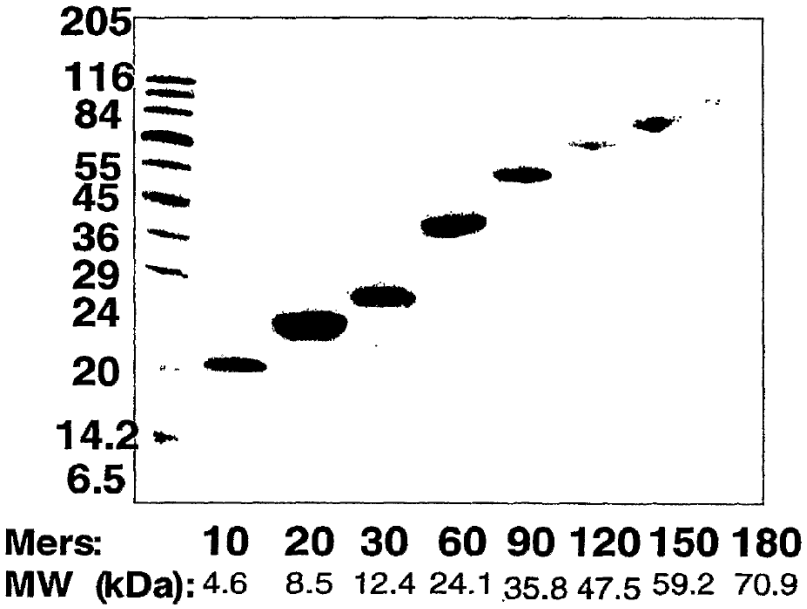


Figura 1. SDS-PAGE de una biblioteca de ELPs que se polimerizan en el nivel génico, expresados en E. coli y purificados explotando la transición de fase de los ELPs.

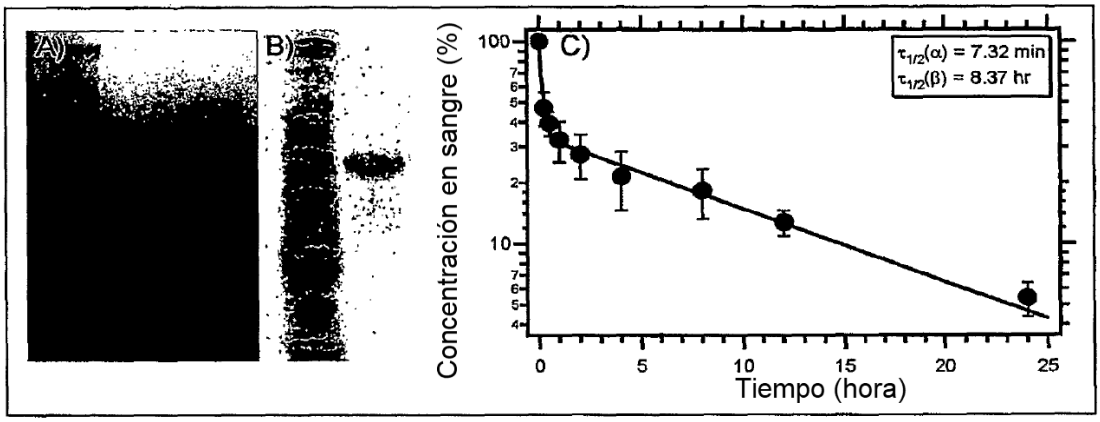


Figura 2. Análisis SDS-PAGE de (A) ^{14}C-ELP visualizado por tinción de cobre, (B) autorradiografía ^{14}C-ELP después de SDS-PAGE. (C) El análisis farmacocinético de ^{14}C-ELP en ratones (Balb/c nu/nu) exhibe una distribución característica y una respuesta de eliminación con una vida media terminal de 8.4 horas.

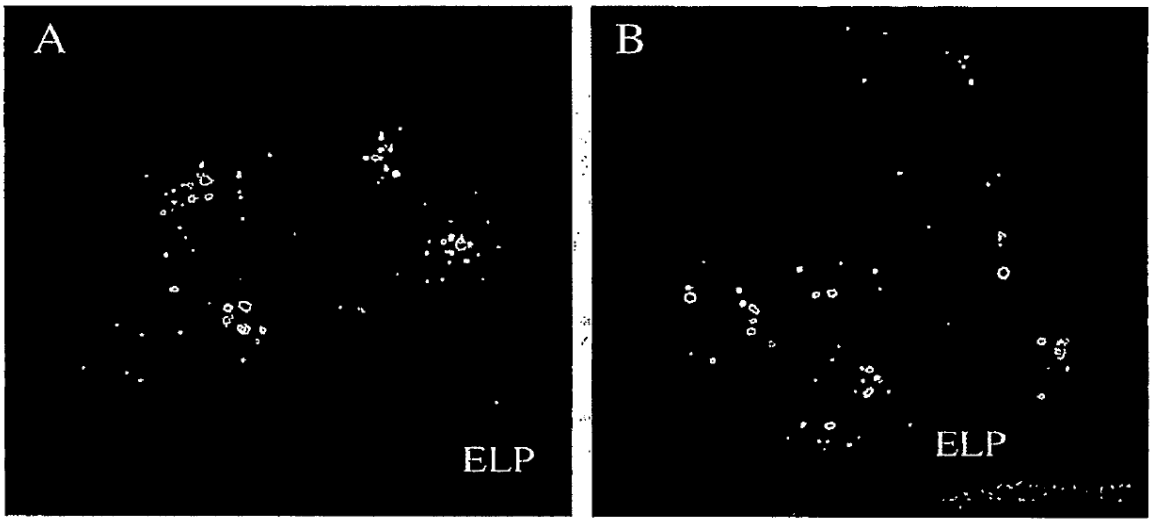


Figura 3. Captación y localización de un ELP.

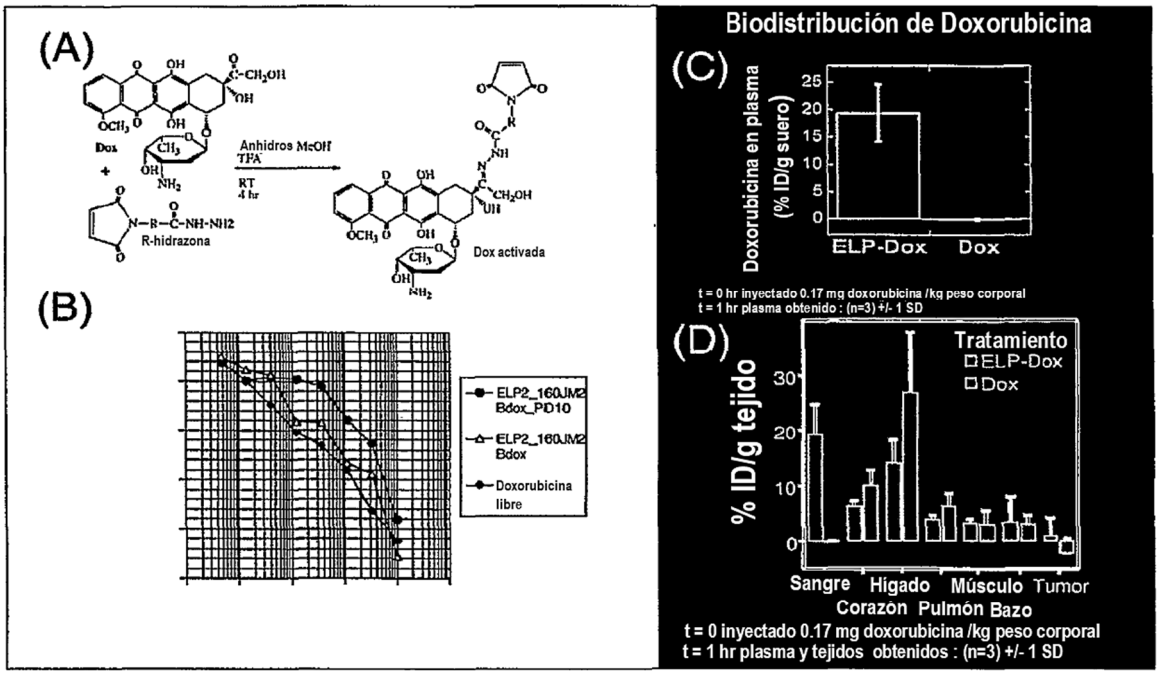


Figura 4. (A) Síntesis de un derivado con una maleimida terminal, (B) Ejemplo de citotoxicidad de Doxorrubicina conjugada con el conjugado ELP2-160JM2 (C) y (D) la distribución de Doxorubicina

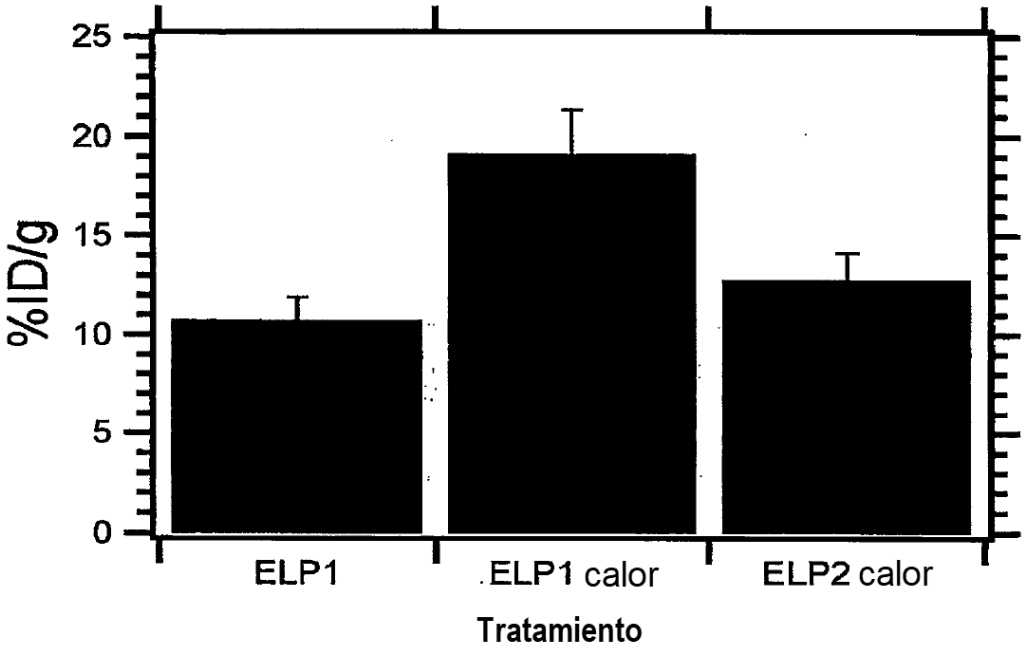


Figura 5. Acumulación de ELPs marcados con ^{14}C en tumores.

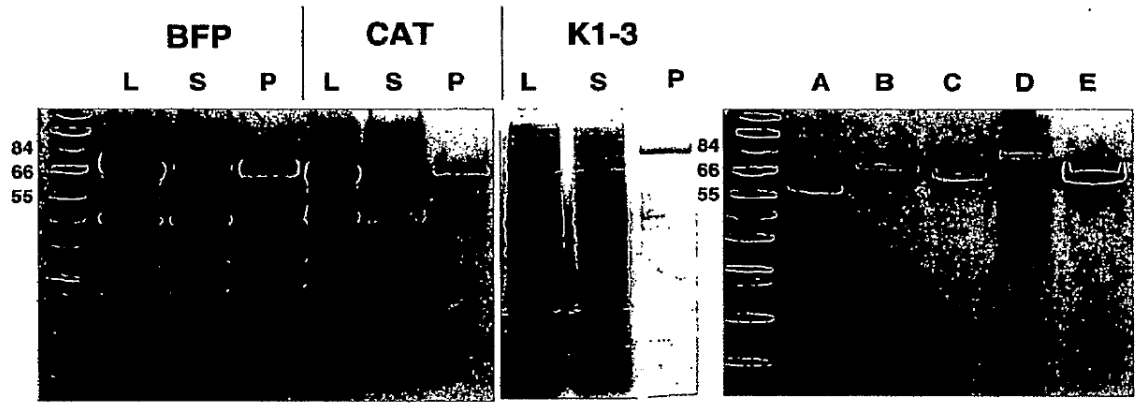


Figura 6. Expresión de diferentes proteínas de fusión ELP como ejemplos de conjugados recombinantes ELP-proteína.

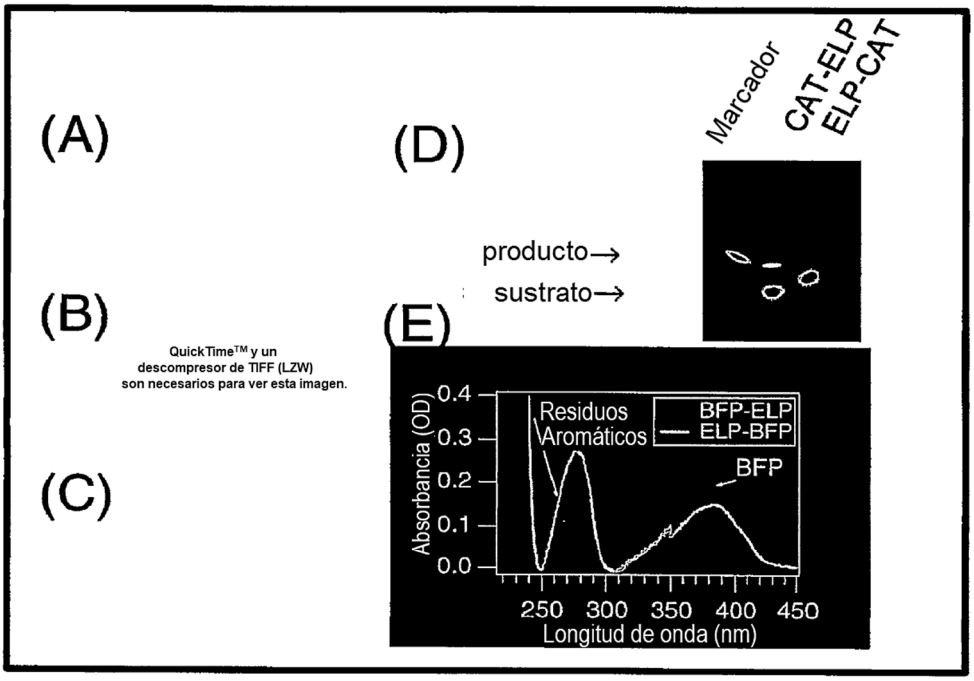


Figura 7. SDS-PAGE de purificación de la proteína de fusión ELP en la siguiente orientación.

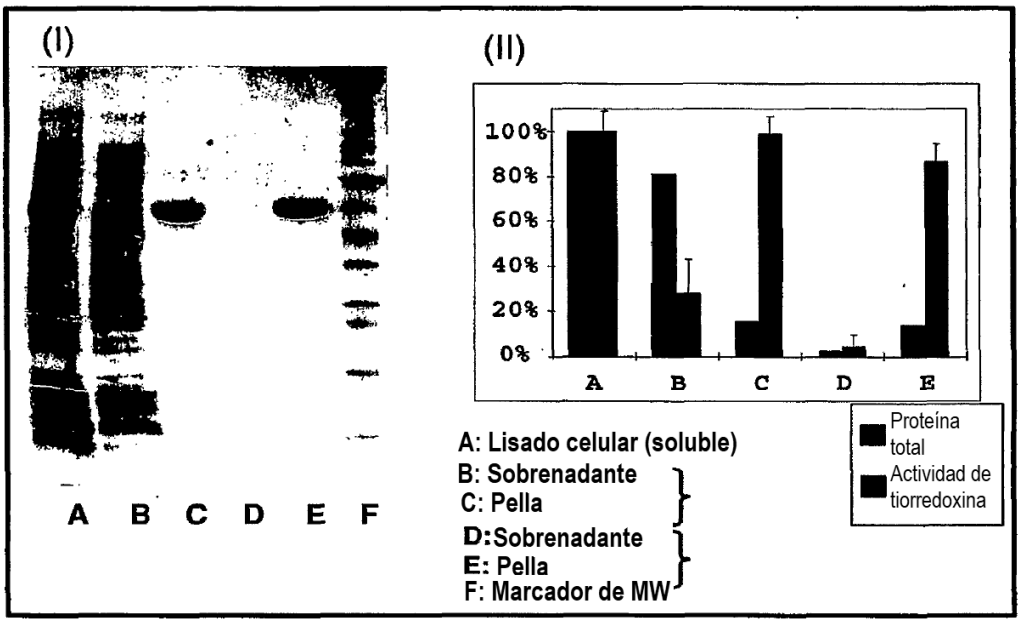


Figura 8. (I) Caracterización de SDS-PAGE de purificaciones de transición inversa, (II) Proteína total (verde) y actividad de tiorredoxina (rojo) para cada etapa de purificación de la tiorredoxina/90-mer ELP

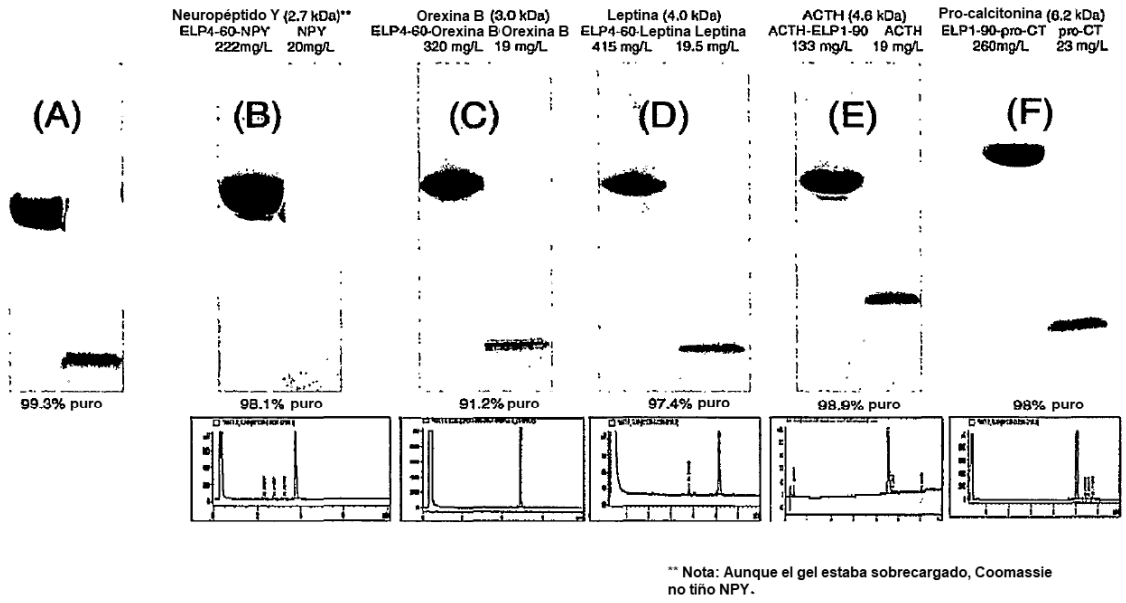


Figura 9. Ejemplos de síntesis de conjugados ELP-péptido, (A) Neuropéptido modulador de la morfina (MMN), (B) Neuropéptido Y (NPY), (C) Orexina B, (D) Leptina (E) ACTH, (F) Pro-calcitonina.

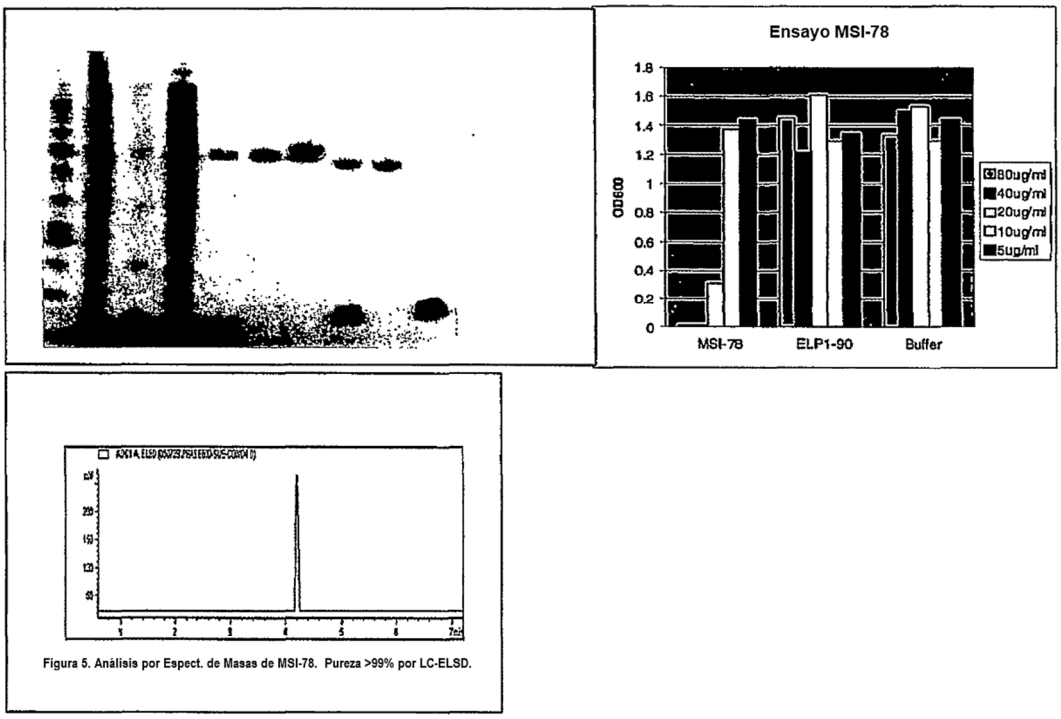


Figura 10. Ejemplos de conjugado ELP-péptido. (A) Purificación de ELP1-90-MSI-78 y MSI-78. (B) Pureza de conjugado EP-MSI-78 determinado mediante cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas.