

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 793**

51 Int. Cl.:

A61K 47/54 (2007.01)

A61K 47/55 (2007.01)

A61K 31/4706 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2011** E **18167760 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020** EP **3372248**

54 Título: **Sistema de suministro in vivo optimizado con agentes endosomolíticos para conjugados de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

22.06.2010 EP 10166936

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

30.09.2020

73 Titular/es:

ONXEO (33.3%)
49, boulevard du Général Martial Valin
75015 Paris, FR;
INSTITUT CURIE (33.3%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%)

72 Inventor/es:

SUN, JIAN-SHENG;
DUTREIX, MARIE y
QUANZ, MARIA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 784 793 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sistema de suministro in vivo optimizado con agentes endosomolíticos para conjugados de ácidos nucleicos

5 Descripción

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la medicina, en particular de la oncología.

10

Antecedentes de la invención

El tratamiento contra el cáncer consiste principalmente en cirugía siempre que sea posible, agentes citotóxicos tales como quimioterapia y radioterapia. En la última década han surgido terapias moleculares para el tratamiento del cáncer, tales como: anticuerpos monoclonales dirigidos a los receptores de la membrana celular, inhibidores del receptor de tirosina cinasa u otras cinasas que dirigen la transducción de señales implicada en la proliferación, muerte y supervivencia celular. Como agentes citostáticos, su régimen de monoterapia carece frecuentemente de un beneficio clínico suficiente. Se obtienen frecuentemente resultados sinérgicos mediante la combinación con agentes citotóxicos pero se limitan por sus efectos secundarios acumulativos.

15

La mayoría de los tratamientos contra el cáncer provocan directa o indirectamente daños en el ADN en las células tumorales proliferantes tratadas, lo que finalmente conduce a su muerte. Sin embargo, varias resistencias intrínsecas y adquiridas del tumor a estos tratamientos son, al menos en parte, debidas a las actividades eficientes de reparación del ADN de las células tumorales. Ahora se reconoce bien que la reparación del ADN es un objetivo importante para la terapia contra el cáncer (Helleday y otros, Nat. Rev. Cancer, 2008, 8:193-204). El desarrollo más avanzado de fármacos en este campo es el de los inhibidores de PARP.

20

25

Como la reparación del ADN es un proceso de supervivencia esencial en todos los seres vivos, tiene múltiples vías de reparación especializadas, y tiene algunas redundancias que hacen al proceso robusto cuando una vía es deficiente o se bloquea por un agente terapéutico, tal como un inhibidor de la reparación del ADN. Por lo tanto, en lugar de dirigirse a un gen/proteína clave implicado en el proceso de reparación del ADN, independientemente de su importancia biológica y relevancia clínica, la terapia molecular innovadora debe abordar una o varias vías clave como un objetivo global, junto con terapias convencionales, para lograr el tratamiento más eficiente contra el cáncer.

30

Se concibió dirigirse globalmente a las vías de detección, señalización y reparación de las lesiones en el ADN para desactivar la defensa de los cánceres frente a los tratamientos existentes. Una estrategia consiste en introducir moléculas de ADN cortas modificadas que imitan rupturas de doble cadena (DSB), llamadas Dbait, en células que hasta entonces podían reparar eficientemente las DSB y por lo tanto sobrevivir. La eficacia antitumoral de las Dbait en asociación con la radioterapia (RT) o la quimioterapia (CT) se explica por el hecho de que las moléculas Dbait atrapan los complejos iniciales de detección de DSB, bloquean la señalización de reparación aguas abajo, desorganizan posteriormente todos los sistemas de reparación de DSB (tanto la unión de extremos no homólogos como las vías de recombinación homóloga), y finalmente inhiben la reparación de las DSB (documento WO2005/040378; documento WO2008/034866; Quanz y otros, 2009, Clinical Cancer Research 15:1308; Quanz y otros, 2009, PLoS ONE 4:e6298; Dutreix y otros 2010, Mut. Res. 704:182). Finalmente, las células cancerosas ya no pueden escapar de su muerte. Se han encontrado que las moléculas Dbait también son eficaces solas, sin una combinación con radioterapia (RT) o quimioterapia (CT) (documento WO2008/084087).

35

40

45

Sin embargo, una vez que se identifican los agentes activos de interés clínico, el problema recurrente es encontrar la mejor manera de suministrar los agentes activos, especialmente para los agentes de ácido nucleico. El desarrollo y optimización de sistemas de suministro de ADN/ARN no virales eficientes tiene que abordar los problemas de toxicidad, las «barreras tisulares y sistémicas» tales como la degradación, la opsonización de partículas mediante componentes del suero cargados, el rápido aclaramiento y la acumulación en tejidos no objetivo, cuando la sustancia activa se administra por vía sistémica, las «barreras celulares» para su suministro tales como la baja captación a través de la membrana citoplasmática, la liberación inadecuada de moléculas de ADN en el compartimento celular activo, y la ausencia de direccionamiento nuclear (requerido para la terapia génica).

50

55

De hecho, para ser eficaces, la mayoría de estos agentes activos tienen que captarse por las células para alcanzar el citoplasma y/o el núcleo. Particularmente, cuando los agentes activos que incluyen ácidos nucleicos se administran en su forma «libre» o desnuda, frecuentemente sufren de degradación antes y después de la captación por las células objetivo. Dentro de las células, esta degradación se debe principalmente al hecho de que los ácidos nucleicos que entran a las células por endocitosis, se secuestran en endosomas celulares que finalmente evolucionan en lisosomas donde la degradación química y enzimática es muy eficiente.

60

En la técnica anterior, los agentes activos se han conjugado a diversos portadores y se han encapsulado en liposomas, micelas y nanopartículas donde se protegen de la degradación en el suero. La técnica anterior emplea, además, una variedad de compuestos químicos para el acoplamiento covalente de ácidos nucleicos y otros agentes activos a

65

portadores moleculares, lo que incluye polímeros tales como dextranos o PEG o moléculas que buscan disminuir el aclaramiento, portadores que incluyen transferrina, moléculas lipófilas tales como el colesterol unido a ARNip para potenciar la captación celular (Chen y otros, 2010, J. Controlled Release 144:227). Dichos portadores pueden incluir restos de direccionamiento tales como anticuerpos, polipéptidos, ácidos nucleicos y otras sustancias para dirigir los agentes activos a las células objetivo seleccionadas. La técnica anterior describe, además, moléculas que mejoran la endocitosis para su uso en una composición farmacéutica (documento US2008/0194540).

Sin embargo, cuando los agentes activos de ADN/ARN se captan por las células a través del proceso de endocitosis, frecuentemente terminan secuestrados en endosomas donde no pueden escapar, lo que reduce por lo tanto grandemente su potencial terapéutico. Por ejemplo, Zimmermann y otros mostraron que un conjugado de colesterol-ARNip(ApoB-1) es aproximadamente 1000 veces menos potente que su formulación liposómica (vector SNALP) en ratones: 100 mg/kg de chol-siApoB-1 es equivalente a 0,1 mg/kg de SNALP- ApoB-1 (Zimmermann y otros, Nature, 2006, 441:111-114, Figura 1 suplementaria).

Para los ácidos nucleicos, la técnica anterior ha intentado resolver este problema a través del uso de polímeros catiónicos tales como polietilenimina (PEI) (documento WO96/02655) o liposomas con lípidos o péptidos fusogénicos tales como el vector SNALP. La PEI es capaz de desestabilizar endosomas mediante un efecto de esponja de protones bien descrito y por lo tanto facilitan la liberación del ácido nucleico. Sin embargo, el uso de la PEI frecuentemente se limita por su citotoxicidad y hasta el momento no se ha aprobado para su uso en seres humanos. La formulación liposómica también presenta toxicidad y encapsulación limitada de ácidos nucleicos (usualmente en el intervalo de 1-2 mg/ml) que puede no ser adecuada para la aplicación que requiere una alta carga útil de agentes de ácidos nucleicos.

Los agentes "endosomolíticos" tales como las cloroquinas se conocen que potencian la transfección de ácidos nucleicos al facilitar su escape de los endosomas hacia el citoplasma en células cultivadas. Sin embargo, el uso de la cloroquina se limita al uso *in vitro* y solo raramente se ha evaluado para ayudar al suministro de ácidos nucleicos *in vivo*. Esto puede deberse a informes en la técnica de ácidos nucleicos que enseñan en contra de su uso *in vivo* debido a la toxicidad de la cloroquina.

Benns, y otros (2000, Bioconj. Chem. 11: 637) reportaron que "Aunque la cloroquina ha demostrado ayudar en la liberación del ADN plasmídico hacia el citoplasma, se ha descubierto que es tóxica y por lo tanto no puede usarse *in vivo*". Este problema se debe parcialmente al hecho de que se necesitan concentraciones relativamente altas de cloroquina libre para alcanzar el mismo sitio que el ácido nucleico (es decir, el ADN plasmídico) en el endosoma. De manera similar, Zhang y otros (2003, J Gene Med 5:209) estudiaron el uso *in vivo* de la cloroquina para el suministro de genes al hígado. En este artículo, usaron un plásmido junto con un péptido (polilisina/molosina) como vector de ADN. Llegaron a la conclusión de que, a pesar de que la cloroquina es eficaz para promover el suministro de genes al hígado, se requiere dosificación múltiple y su uso se limita por la toxicidad sistémica. De hecho, demostraron que la toxicidad aguda de la cloroquina sistémica limita su uso *in vivo* a niveles que están sustancialmente más abajo de los requeridos para el suministro óptimo de genes. El suministro local de cloroquina también se limita por la toxicidad local de la cloroquina y por su difusión fuera del sitio de suministro. Finalmente, no observaron un suministro de genes o un nivel muy bajo cuando se usa ADN desnudo.

En este contexto, el documento WO2007/040469 describe que la solución al problema de la necesaria concentración alta de cloroquina puede superarse al acoplar covalentemente la cloroquina al agente activo, lo que reduce de esta manera la dosificación total necesaria. El documento WO2009/126933 propone unir covalentemente el ácido nucleico para el suministro tanto a un agente endosomolítico como a un ligando de direccionamiento.

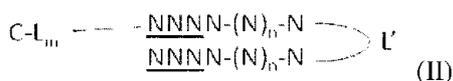
La cloroquina y sus derivados tales como la hidroxiclороquina se usan en el tratamiento curativo y profiláctico de la malaria. Además, se ha estudiado para su uso en combinación con radioterapia y/o quimioterapia de cánceres (Sotelo y otros, 2006, Ann Intern Med 144:337-342; documentos NCT01023477 y NCT00969306). La hipótesis es que la cloroquina/hidroxiclороquina inhibe la autofagia que es un proceso normal de defensa celular mediante la exportación de agentes terapéuticos a los lisosomas donde se degradan.

En conclusión, la optimización de terapias basadas en ácidos nucleicos requiere abordar más profundamente la eficacia y citotoxicidad de los sistemas de suministro de ADN sintético.

Breve descripción de la invención

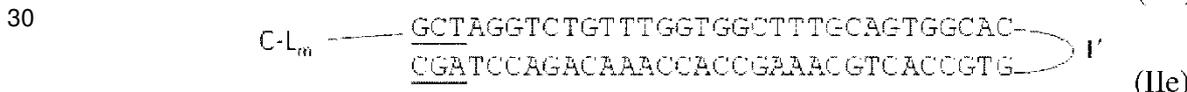
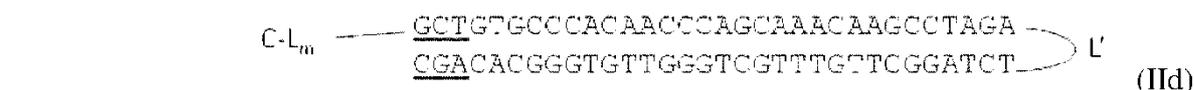
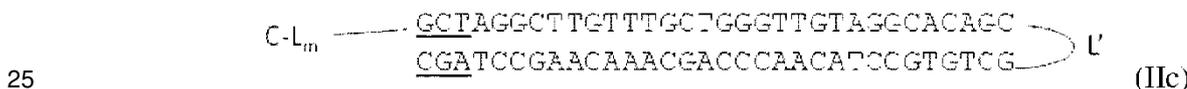
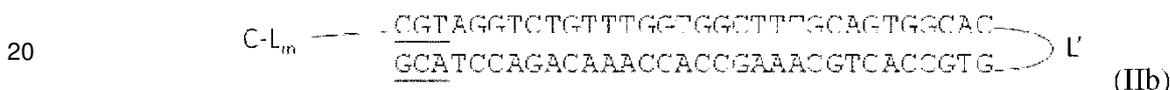
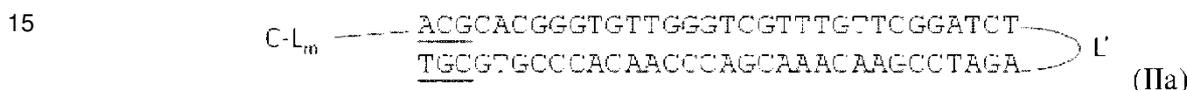
El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no caiga dentro de las reivindicaciones se proporciona solo a modo de información.

La presente descripción se refiere a un nuevo método eficiente para el suministro *in vivo* de ácidos nucleicos de interés terapéutico basado en la conjugación covalente de ácidos nucleicos de interés terapéutico con una molécula que facilita la endocitosis. En particular, este sistema de suministro *in vivo* se usa para moléculas Dbait. Más particularmente, la molécula de ácido nucleico conjugada tiene la siguiente fórmula:



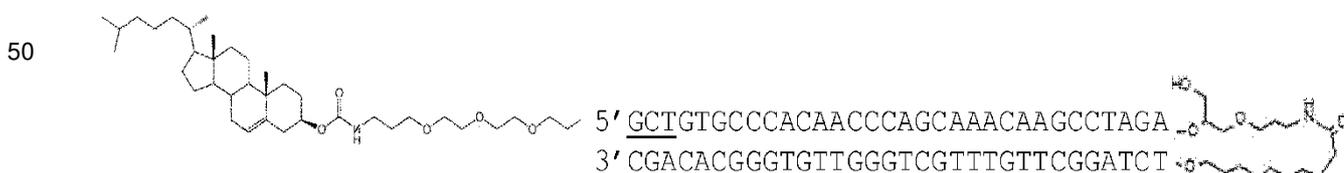
5 en donde N es un desoxinucleótido, n es un número entero de 21 a 95, la N subrayada se refiere a un nucleótido que tiene una cadena principal de fosfodiéster modificada, L' es un enlazador, C se selecciona del grupo que consiste en ácido graso octadecil o dioleoil, folatos o ácido fólico y colesterol, L es un oligoetilenglicol carboxamido, m es 1. Preferentemente, el enlazador L' se selecciona del grupo que consiste en hexaetilenglicol, tetradesoxtimidilato (T4), 1,19-bis(fosfo)-8-hidraza-2-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano y 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano; y/o, m es 1 y L es un oligoetilenglicol carboxamido, preferentemente, un trietilenglicol carboxamido; y/o C se selecciona del grupo que consiste en ácido graso octadecil o dioleoil, folatos o ácido fólico y colesterol. Aún con mayor preferencia, C es colesterol.

En un aspecto más particular, la molécula de ácido nucleico conjugada tiene una de las siguientes fórmulas:



35 Preferentemente, el nucleótido subrayado se refiere a un nucleótido que tiene una cadena principal de fosforotioato o metilfosfonato. Preferentemente, el nucleótido subrayado se refiere a un nucleótido que tiene una cadena principal de fosforotioato; y/o, el enlazador L' se selecciona del grupo que consiste en hexaetilenglicol, tetradesoxtimidilato (T4) y 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano; y/o, m es 1 y L es trietilenglicol carboxamido, tetraetilenglicol carboxamido, oligoetilenglicol carboxamido, con mayor preferencia, un trietilenglicol carboxamido; y/o se selecciona del grupo que consiste en octadecil trietilenglicol, y/o C se selecciona del grupo que consiste en ácido graso octadecil o dioleoil, folatos o ácido fólico y colesterol. Con mayor preferencia, el enlazador L' se selecciona del grupo que consiste en hexaetilenglicol, tetradesoxtimidilato (T4) y 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano; y m es 1 y L es un polietilenglicol carboxamido, preferentemente, un trietilenglicol carboxamido, y C se selecciona del grupo que consiste en ácidos grasos octadecil o dioleoil, folatos y colesterol. Con mayor preferencia, C se selecciona del grupo que consiste en dioleoil, octadecil, ácido fólico y colesterol. Aún con mayor preferencia, C es colesterol.

En un aspecto muy específico, la molécula de ácido nucleico conjugada es



55 en donde el nucleótido subrayado se refiere a un nucleótido que tiene una cadena principal de fosforotioato.

Breve descripción de los dibujos

60 Figura 1: Captación celular de Dbait formulada. (A) Análisis por microscopía de complejos de Dbait con PEI11k (a). (B) El análisis por citometría de flujo de la captación celular se realizó 5 horas después del inicio del tratamiento para diversas condiciones de transfección. Dbait-cy3 con Superfect, 2 µg/ml de coDbait-cy3 sin y con tratamiento de cloroquina antes de la transfección, 25 µg/ml de coDbait-cy3 sin y con CQ.

65 Figura 2: Actividad de la Dbait formulada. (A) La activación de ADN-PK se midió después de la adición de 50 u del complejo enzimático purificado a sin ADN, 0,25 µg de Dbait o 0,25 µg de coDbait, (B) inmunodetección de γ-H2AX en

células 24 horas después del tratamiento con 1,6 µg/ml de Dbait (izquierda), 1,6 µg/ml de Dbait/PEI11K (medio), 16 µg/ml de coDbait con CQ. barra de escala: 20 µm. (C) Cuantificación de γ-H2AX, 5 horas (negro) y 24 horas (gris) después del tratamiento mediante diversas Dbait formuladas. Todas las transfecciones se realizaron con 1,6 µg/ml de Dbait o 16 µg/ml de coDbait. Cuando se indica, la CQ se añadió antes de la transfección

5

Figura 3: Fenotipos 24 horas después de la inyección de Dbait en el espacio extracelular de embriones de pez cebra en estadio celular 1K. (A-C) Vistas laterales anteriores a la izquierda de embriones de pez cebra 24 horas después de la inyección de Dbait-cy3 + PEI (2-5 nl) en el polo animal de embriones de pez cebra en estadio celular 1K: panel superior, vista de campo brillante; panel inferior, aumento 2x de la región de la cabeza con recubrimiento de epifluorescencia que muestra Dbait-cy3 en rojo. (A) Fenotipo de tipo 1 no distinguible del no inyectado (no se muestra). (B) Fenotipo leve de tipo 2 con muerte celular extensa en la región de la cabeza. (C) Teratogénesis fuerte de tipo 3 y muerte celular generalizada. (D) Histograma que muestra el porcentaje de las tres clases fenotípicas en dependencia del adyuvante. Se analizaron más de 100 embriones para cada condición. NA: Dbait inyectada sola; Sup: Superfect; PEI 25k, 22k, 11k del tamaño correspondiente; cloro: cloroquina; Lut: Lutrol.

10

15

Figura 4: Difusión y actividad en tumores. Los tumores se inyectaron con 1,6 µg de Dbait-cy5.5/PEI o 16 µg de coDbait-cy5.5 (1/10 de cdDbait marcada con cy5.5 + 9/10 de coDbait no marcada para mantener una intensidad de fluorescencia similar) y se analizaron el día siguiente para determinar la distribución de la fluorescencia y la actividad de ADN-PKs. Difusión de Dbait fluorescente después de dos tipos de inyecciones: una inyección intratumoral o dos inyecciones subcutáneas.

20

Figura 5: Supervivencia de 5 grupos de ratones desnudos que portan xenoinjerto de melanoma SK28: 1) no tratados (n=16); 2) irradiados (IR, n=12); 3) irradiados con 1 mg de cloroquina inyectada por vía intraperitoneal (CQ, IR, n=10); 4) tratados con 0,6 mg de DT01 inyectada por vía intratumoral (también denominada CoDbait) e irradiados 5 horas más tarde (DT01, IR, n=11) y 5) tratados previamente con 1 mg de cloroquina inyectada por vía intraperitoneal 2 horas antes de la inyección intratumoral de 0,6 mg de DT01 (también denominada CoDbait) e irradiados 5 horas más tarde (DT01, CQ, IR, n=13).

25

Figura 6. Estudio del crecimiento tumoral del melanoma SK28 injertado sobre ratones desnudos. Arriba: protocolo de tratamiento: 4 tratamientos de DT01 (también denominada CoDbait) combinados con 4 sesiones de irradiación (RT) en dos semanas. 4 mg de DT01 se inyectaron por vía subcutánea en dos puntos opuestos separados por 5 mm del límite del tumor. Los animales se trataron previamente antes del inicio del tratamiento y durante el tratamiento con DT01+RT con 1 mg de cloroquina (CQ) dos veces por semana mediante administración oral (p.o.)*. En el medio: Valor medio del crecimiento tumoral de diversos grupos de animales: No tratado o CQ: no tratado o tratado solamente con CQ (n=11); RT o CQ+RT: irradiado con o sin un cotratamiento de cloroquina (n=16); DT01+RT: tratado con DT01 e irradiación (n=10); DT01+CQ+RT: tratado con DT01 con cloroquina e irradiación (n=12). Abajo: Detalles de los grupos DT01+RT y DT01+CQ+RT. Cada curva corresponde a un crecimiento tumoral.

30

35

Figura 7: La actividad de ADN-PK se monitoreó mediante el uso del kit de ensayo de proteína cinasa dependiente de ADN SignaTECT (Promega, Madison, WI, EE.UU.). El sustrato de péptido biotinilado, 50 unidades de ADN-PK (Promega, Madison, WI, EE.UU.) y 500 nM de diversas moléculas Dbait se incubaron durante 5 min a 30 °C con (γ-32P)ATP de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El sustrato biotinilado se capturó en una membrana de estreptavidina, se lavó y se contó en un contador de centelleo. El porcentaje de fosforilación se calculó al dividir la radioactividad unida por el conteo total de (γ-32P)ATP por muestra. La Dbait32Hc es una molécula Dbait no conjugada. 0813, 0815, 0902, 0903, 0904 y 0905 son moléculas Dbait conjugadas (consultar Tablas de "Moléculas Dbait conjugadas alternativas"). Dbait8H es una Dbait corta (8 pb) usada como control negativo de la actividad de ADN-PK.

40

45

Figura 8: Actividad de moléculas Dbait medidas mediante fosforilación de H2AX. Inmunodetección del γ-H2AX en la línea celular MRC5 24 horas después de la transfección de diversas moléculas Dbait conjugadas (consultar Tablas de "Moléculas Dbait conjugadas alternativas") con o sin tratamiento previo con 50 µM de cloroquina. La Dbait formulada con polietilenimina (PEI) se usó como control positivo.

50

Descripción detallada de la invención

55

La introducción de moléculas de ADN pequeñas (Dbait) altera la reparación del ADN de cromosomas dañados y proporciona un método eficiente para potenciar la eficiencia de la radioterapia o quimioterapia en los tumores, particularmente en tumores resistentes. Sin embargo, la actividad sensibilizante de las moléculas Dbait depende de la eficiencia de su suministro dentro de las células tumorales.

60

Por lo tanto, los inventores compararon diferentes estrategias para mejorar esta etapa clave. Para probar las estrategias, desarrollaron un flujo de trabajo de ensayos: (i) análisis molecular de complejos formados con moléculas Dbait, (ii) pruebas celulares para la captación y actividad de Dbait, (iii) monitoreo por microscopía confocal de embriones vivos de pez cebra para determinar la distribución in vivo y la actividad biológica de las moléculas formuladas. Estas pruebas permitieron la selección de las formulaciones y protocolos de administración más eficientes antes de los ensayos en tumores xenoinjertados en ratón. Se compararon dos clases de formulación: polímeros policatiónicos con polietilenimina lineal o ramificada (PEI), y Dbait unida covalentemente al colesterol (coDbait). Los

65

complejos de PEI lineales fueron los más eficientes para la transfección de Dbait *in vitro* e *in vivo* pero mostraron una alta toxicidad. De hecho, se requirieron dosis 10 veces mayor de coDbait usadas con 1 mg de cloroquina (de acuerdo con la conversión alométrica, equivalente a la dosis profiláctica usada en seres humanos) para observar el mismo efecto antitumoral en el melanoma xenoinjertado que con las Dbait cuando se formularon con PEI. Sin embargo, se encontró que las dosis probadas de coDbait administradas con cloroquina no eran tóxicas.

En consecuencia, la presente descripción describe la combinación y el protocolo de administración del conjugado colesterol- ácido nucleico con cloroquina administrada sistémicamente a una dosis clínica relevante, en particular el uso del conjugado colesterol-Dbait con dosis profilácticas de cloroquina (mediante la conversión alométrica en animales), sin toxicidad notable. Los inventores mostraron que una cantidad 10 veces mayor (10x) de colesterol-Dbait tiene una potencia similar en comparación con 1x de Dbait vectorizada por un sistema de vectores no virales en ratones, en lugar de 1000 veces sin el uso de cloroquina descrita en la técnica anterior. Esto hace que la conjugación de ácidos nucleicos terapéuticos a un agente lipófilo o de direccionamiento a células sea un sistema de suministro seguro y económicamente utilizable.

En consecuencia, a pesar de la necesidad de una dosis mayor de coDbait, los inventores descubrieron sorprendentemente que:

- 1) La combinación de coDbait con cloroquina presenta una toxicidad baja, si existe, *in vivo*. Esto permite mejorar el índice terapéutico (relación de dosis eficaz/dosis con toxicidad) de casi 1 para Dbait/PEI a >20 para coDbait; se ha observado la ausencia de toxicidad después de la inyección intravenosa, inyección subcutánea e incluso después de la inyección intracerebral en ratón, rata, conejo y mono;
- 2) La combinación de coDbait con cloroquina proporciona una activación retardada y sostenida de ADN-PK (objetivo principal de las Dbait) y permite un efecto terapéutico prolongado. Más particularmente, se observa un aumento de la actividad o del efecto durante el período de tiempo;
- 3) Sorprendentemente, el coDbait se difunde bien en tumor/tejido en comparación con Dbait/PEI.
- 4) Por primera vez, el inventor observó que la cloroquina permite el aumento de la captación celular de coDbait mientras que este efecto es menos pronunciado con el colesterol conjugado a moléculas de ARNip.

Basado en estas observaciones, la presente descripción se refiere a

- una composición farmacéutica que comprende una molécula Dbait conjugada o una molécula de ácido nucleico en horquilla como se describe más abajo, y opcionalmente b) un agente antitumoral que daña el ADN, y un portador aceptable farmacéuticamente, particularmente para su uso en el tratamiento del cáncer;
- un producto o kit que contiene (a) una molécula Dbait conjugada o una molécula de ácido nucleico en horquilla como se describe más abajo, y opcionalmente b) un agente antitumoral que daña el ADN, como una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial, en particular en el tratamiento del cáncer;
- una composición farmacéutica que comprende una molécula Dbait conjugada o una molécula de ácido nucleico en horquilla como se describe más abajo, para el uso en el tratamiento del cáncer en combinación con radioterapia y/o un agente antitumoral que daña el ADN;
- el uso de una composición farmacéutica que comprende una molécula Dbait conjugada o una molécula de ácido nucleico en horquilla, como se describe más abajo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en combinación con radioterapia y/o un agente antitumoral que daña el ADN o para aumentar la eficiencia del tratamiento del cáncer con radioterapia y/o un agente antitumoral que daña el ADN o para mejorar la sensibilidad del tumor a la radioterapia y/o al tratamiento con un agente antitumoral que daña el ADN.

Los términos "kit", "producto" o "preparación combinada", como se usan en la presente descripción, definen especialmente un "kit de partes" en el sentido de que las parejas de combinación (a) y (b), y opcionalmente (c), según se definió anteriormente pueden dosificarse independientemente o mediante el uso de diferentes combinaciones fijadas con cantidades diferentes de las parejas de las combinaciones (a) y (b), y opcionalmente (c), es decir, simultáneamente o en diferentes puntos de tiempo. Las partes del kit de partes pueden entonces, por ejemplo, administrarse de manera simultánea o cronológicamente escalonadas, es decir en puntos de tiempo diferentes y con intervalos de tiempo iguales o diferentes para cualquier parte del kit de partes. La relación de las cantidades totales de la pareja de combinación (a) con respecto a la pareja de combinación (b), y opcionalmente (c), a administrarse en la preparación combinada, puede variar. Las parejas de combinación (a) y (b) y opcionalmente (c) pueden administrarse por la misma vía o por vías diferentes.

Dentro del contexto de la invención, el término tratamiento indica un tratamiento curativo, sintomático, y preventivo. Las composiciones farmacéuticas, kits, productos y preparaciones combinadas de la invención pueden usarse en seres humanos con cáncer o tumor existentes, lo que incluye estadios tempranos o tardíos de progresión del cáncer. Las composiciones farmacéuticas, kits, productos y preparaciones combinadas de la invención no necesariamente curarán al paciente que tiene el cáncer, sino que retrasarán o enlentecerán la progresión o evitarán una progresión posterior de la enfermedad, lo que mejora de esta manera la condición del paciente. En particular, las composiciones farmacéuticas, kits, productos y preparaciones combinadas de la invención reducen el desarrollo de los tumores, reducen la carga tumoral, producen regresión tumoral en un huésped mamífero y/o previenen la aparición de

metástasis y la recaída del cáncer. En el tratamiento del cáncer, la composición farmacéutica de la invención se administra en una cantidad eficaz terapéuticamente.

5 Por "cantidad eficaz" se entiende la cantidad de la composición farmacéutica de la invención que previene, elimina o reduce los efectos perjudiciales del cáncer en los mamíferos, lo que incluye los seres humanos, sola o en combinación con los otros ingredientes activos de la composición farmacéutica, kit, producto o preparación combinada. Se entiende que la dosis administrada puede adaptarse por los expertos en la técnica de acuerdo con el paciente, la patología, el modo de administración, etcétera.

10 Siempre que se menciona dentro de toda esta descripción "tratamiento de un cáncer" o similares con referencia a la composición farmacéutica de la invención, se entiende: a) una composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento de un cáncer; y/o b) el uso de una composición farmacéutica de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer.

15 Moléculas Dbait

Las moléculas Dbait se han descrito extensamente en las solicitudes de patente PCT WO2005/040378, WO2008/034866 y WO2008/084087.

20 Las moléculas Dbait pueden definirse por una serie de características necesarias para su actividad terapéutica, tales como su longitud mínima, la presencia de al menos un extremo libre, y la presencia de una porción bicatenaria, preferentemente, una porción de ADN bicatenario. Como se analizará más abajo, es importante señalar que la secuencia de nucleótidos precisa de las moléculas Dbait no tiene efecto en su actividad. Además, las moléculas Dbait pueden contener una cadena principal modificada y/o no natural.

25 Preferentemente, las moléculas Dbait son de origen no humano (es decir, su secuencia de nucleótidos y/o conformación (por ejemplo, horquilla) no existe como tal en una célula humana), con la máxima preferencia, de origen sintético. Dado que la secuencia de las moléculas Dbait tienen poca, si la tienen, función, las moléculas Dbait no tienen, preferentemente, un grado significativo de homología o identidad de secuencia con genes, promotores, potenciadores, secuencias aguas arriba 5' o 3', exones e intrones conocidos. En otras palabras, las moléculas Dbait tienen menos de 80 % o 70 %, incluso menos de 60 % o 50 % de identidad de secuencia con cualquier gen en un genoma humano. Los métodos para determinar la identidad de secuencia se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, BLASTN 2.2.25. Por genoma humano, se considera, preferentemente, para determinar el porcentaje de identidad el Human Genome Build 37 (referencia GRCh37.p2 y conjuntos alternos). Las moléculas Dbait no se hibridan, en condiciones rigurosas, con el ADN genómico humano. Las condiciones rigurosas típicas son tales que permiten la discriminación de ácidos nucleicos completamente complementarios a partir de ácidos nucleicos parcialmente complementarios.

40 Además, la secuencia de las moléculas Dbait carece, preferentemente, de CpG para evitar las bien conocidas reacciones inmunitarias mediadas por receptores similares a toll.

45 La longitud de las moléculas Dbait puede variar, siempre y cuando sea suficiente para permitir la unión apropiada del complejo de proteína Ku que comprende Ku y las proteínas ADN-PKcs. Se ha mostrado que la longitud de las moléculas Dbait debe ser mayor que 20 pb, preferentemente, aproximadamente 32 pb, para asegurar la unión a dicho complejo de Ku y permitir la activación de ADN-PKcs. Preferentemente, las moléculas Dbait comprenden entre 20-200 pb, con mayor preferencia, 24-100 pb, aún con mayor preferencia, 26-100, y con la máxima preferencia, entre 32-100 pb. Por ejemplo, las moléculas Dbait comprenden entre 24-160, 26-150, 28-140, 30-120 o 32-100 pb. Por "bp" se entiende que la molécula comprende una porción bicatenaria de la longitud indicada.

50 En un aspecto particular, las moléculas Dbait que tienen una porción bicatenaria de al menos 32 pb, o de aproximadamente 32 pb, comprenden la misma secuencia de nucleótidos que Dbait32 (SEQ ID NO: 1), Dbait32Ha (SEQ ID NO: 2), Dbait32Hb (SEQ ID NO: 3), Dbait32Hc (SEQ ID NO: 4) o Dbait32Hd (SEQ ID NO: 5). Opcionalmente, las moléculas Dbait tienen la misma composición de nucleótidos que Dbait32, Dbait32Ha, Dbait32Hb, Dbait32Hc o Dbait32Hd pero su secuencia de nucleótidos es diferente. En tal caso, las moléculas Dbait comprenden una cadena de la porción bicatenaria con 3 A, 6 C, 12 G y 11 T. Preferentemente, la secuencia de las moléculas Dbait no contiene ningún dinucleótido CpG.

60 Alternativamente, la porción bicatenaria comprende al menos 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 o 32 nucleótidos consecutivos de Dbait32 (SEQ ID NO: 1), Dbait32Ha (SEQ ID NO: 2), Dbait32Hb (SEQ ID NO: 3), Dbait32Hc (SEQ ID NO: 4) o Dbait32Hd (SEQ ID NO: 5). En un aspecto más particular, la porción bicatenaria consiste en 20, 22, 24, 26, 28, 30 o 32 nucleótidos consecutivos de Dbait32 (SEQ ID NO: 1), Dbait32Ha (SEQ ID NO: 2), Dbait32Hb (SEQ ID NO: 3), Dbait32Hc (SEQ ID NO: 4) o Dbait32Hd (SEQ ID NO: 5).

65 La Dbait debe tener al menos un extremo libre, como una imitación de DSB. Dicho extremo libre puede ser un extremo romo libre o un extremo saliente 5'-/3'-. El "extremo libre" se refiere en la presente descripción a una molécula de ácido nucleico, en particular una porción de ácido nucleico bicatenario, que tiene tanto un extremo 5' como un extremo 3' o

que tiene un extremo 3' o un extremo 5'. Opcionalmente, uno de los extremos 5' y 3' puede usarse para conjugar la molécula Dbait o puede unirse a un grupo de bloqueo, por ejemplo, un enlace nucleotídico 3'-3'.

En un aspecto particular, contienen dos extremos libres y pueden ser lineales. En consecuencia, las moléculas Dbait pueden ser, además, una molécula bicatenaria con dos extremos libres y con la secuencia de nucleótidos de Dbait32 (SEQ ID NO: 1), Dbait32Ha (SEQ ID NO: 2), Dbait32Hb (SEQ ID NO: 3), Dbait32Hc (SEQ ID NO: 4) o Dbait32Hd (SEQ ID NO: 5).

En otro aspecto particular, contienen solo un extremo libre. Preferentemente, las moléculas Dbait se forman de ácidos nucleicos en horquilla con un tallo de ADN bicatenario y un lazo. El lazo puede ser un ácido nucleico, u otros grupos químicos conocidos por un experto o una mezcla de estos. Un enlazador de nucleótidos puede incluir de 2 a 10 nucleótidos, preferentemente, 3, 4 o 5 nucleótidos. Los enlazadores no nucleotídicos incluyen de manera no exhaustiva un nucleótido básico, poliéter, poliamina, poliamida, péptido, carbohidrato, lípido, polihidrocarburo u otros compuestos poliméricos (por ejemplo, oligoetilenglicoles tales como aquellos que tienen entre 2 y 10 unidades de etilenglicol, preferentemente, 4, 5, 6, 7 u 8 unidades de etilenglicol). Un enlazador preferido se selecciona del grupo que consiste en hexaetilenglicol, tetradexoxitimidilato (T4) y otros enlazadores tales como 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano. En consecuencia, en un aspecto particular, las moléculas Dbait pueden ser una molécula en horquilla que tiene una porción o tallo bicatenario que comprende al menos 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 o 32 nucleótidos consecutivos de Dbait32 (SEQ ID NO: 1), Dbait32Ha (SEQ ID NO: 2), Dbait32Hb (SEQ ID NO: 3), Dbait32Hc (SEQ ID NO: 4), o Dbait32Hd (SEQ ID NO: 5), y un lazo que es un enlazador de hexaetilenglicol, un enlazador de tetradexoxitimidilato (T4) o 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano. En un aspecto más particular, las moléculas Dbait pueden tener una porción bicatenaria que consiste en 20, 22, 24, 26, 28, 30 o 32 nucleótidos consecutivos de Dbait32 (SEQ ID NO: 1), Dbait32Ha (SEQ ID NO: 2), Dbait32Hb (SEQ ID NO: 3), Dbait32Hc (SEQ ID NO: 4) o Dbait32Hd (SEQ ID NO: 5).

Las moléculas Dbait comprenden, preferentemente, una cadena principal de 2'-desoxinucleótido, y comprenden opcionalmente uno o varios (2, 3, 4, 5 o 6) nucleótidos y/o nucleobases modificados diferentes de adenina, citosina, guanina y timina. En consecuencia, las moléculas Dbait son esencialmente una estructura de ADN. En particular, la porción o tallo bicatenario de las moléculas Dbait se forman por desoxirribonucleótidos.

Las moléculas Dbait preferidas comprenden uno o varios nucleótidos o grupos modificados químicamente al extremo de una o de cada cadena, en particular para protegerlos de la degradación. En un aspecto particular preferido, el o los extremos libres de las moléculas Dbait se protegen por una, dos o tres cadenas principales de fosfodiéster modificadas al extremo de una o de cada cadena. Los grupos químicos preferidos, en particular la cadena principal de fosfodiéster modificada, comprenden fosforotioatos. Alternativamente, la Dbait preferida tiene un enlace de nucleótido 3'-3', o nucleótidos con cadena principal de metilfosfonato. Otras cadenas principales modificadas se conocen bien en la técnica y comprenden fosforamidatos, ácido nucleico morfolino, ácido nucleico bloqueado con puente metileno/etileno 2'-O,4'-C, ácido nucleico peptídico (PNA), y alquilo de cadena corta, o enlaces interazúcar de cicloalquilo o enlaces intraazúcar heterocíclicos o heteroatómicos de cadena corta de longitud variable, o cualquier nucleótido modificado conocido por un experto. En un primer aspecto preferido, las moléculas Dbait tienen uno o más extremos libres protegidos por una, dos o tres cadenas principales de fosfodiéster modificadas al final de una o de cada cadena, con mayor preferencia, por tres cadenas principales de fosfodiéster modificadas (en particular fosforotioato o metilfosfonato) al menos en el extremo 3', pero aún con mayor preferencia, en ambos extremos 5' y 3'.

En un aspecto más preferido, la molécula Dbait es una molécula de ácido nucleico en horquilla que comprende una porción o tallo bicatenario de ADN de 32 pb (por ejemplo, con una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO 1-5, en particular la SEQ ID NO 4) y un lazo que une las dos cadenas de la porción o tallo bicatenario de ADN que comprende o consiste en un enlazador seleccionado del grupo que consiste en hexaetilenglicol, tetradexoxitimidilato (T4) y 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano, los extremos libres de la porción o tallo bicatenario de ADN (es decir, en el lado opuesto al lazo) que tiene tres cadenas principales de fosfodiéster modificadas (en particular, enlaces internucleotídicos de fosforotioato).

Dichas moléculas Dbait se fabrican mediante síntesis química, semibiosíntesis o biosíntesis, cualquier método de amplificación, seguido de cualesquiera métodos de extracción y preparación y cualquier modificación química. Los enlazadores se proporcionan para que se incorporen por síntesis química estándar de ácidos nucleicos.

Con mayor preferencia, las moléculas Dbait se fabrican mediante síntesis convergente diseñada especialmente: dos cadenas complementarias se preparan mediante síntesis química estándar de ácidos nucleicos con la incorporación de un precursor de enlazador apropiado, después de su purificación, se acoplan covalentemente entre sí.

Moléculas Dbait conjugadas

La presente descripción se refiere a moléculas Dbait conjugadas a moléculas que facilitan la endocitosis o la captación celular.

En particular, las moléculas pueden ser moléculas lipófilas tales como colesterol, ácidos grasos de cadena simple o doble, o ligandos cuyos receptores de células objetivo permiten la endocitosis mediada por receptores, tales como ácido fólico y derivados de folato o transferrina (Goldstein y otros Ann. Rev. Cell Biol. 1985 1:1-39; Leamon y Lowe, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 1991, 88: 5572-5576). Los ácidos grasos pueden ser saturados o no saturados y serlo en C4-C28, preferentemente, en C14-C22, aún con mayor preferencia, serlo en C18 tal como el ácido oleico o el ácido esteárico. En particular, los ácidos grasos pueden ser octadecil o dioleoil. Los ácidos grasos pueden encontrarse como forma de cadena doble unida con un enlazador apropiado tal como un glicerol, una fosfatidilcolina o etanolamina o enlazados entre sí por los enlazadores usados para unirse en la molécula Dbait. Como se usa en la presente descripción, el término "folato" se refiere a folatos y derivados de folatos, lo que incluye derivados y análogos del ácido ptericoico. Los análogos y derivados de ácido fólico adecuados para su uso en la presente descripción incluyen antifolatos, dihidrofolatos, tetrahidrofolatos, ácido folínico, ácido pteropoli-glutámico, folatos 1-deaza, 3-deaza, 5-deaza, 8-deaza, 10-deaza, 1,5-deaza, 5,10 dideaza, 8,10-dideaza y 5,8-dideaza, antifolatos, y derivados de ácido ptericoico. Los análogos de folatos adicionales se describen en el documento US2004/242582. La molécula que facilita la endocitosis puede ser tocoferol, azúcar tal como galactosa y manosa y su oligosacárido, péptido tal como RGD y bombesina, y proteínas tales como la integrina. En consecuencia, la molécula que facilita la endocitosis puede seleccionarse del grupo que consiste en ácidos grasos de cadena simple o doble, folatos y colesterol. Con mayor preferencia, la molécula que facilita la endocitosis se selecciona del grupo que consiste en dioleoil, octadecil, ácido fólico, y colesterol. En una modalidad más preferida, la molécula Dbait se conjuga a un colesterol.

Las moléculas que facilitan la endocitosis se conjugan a moléculas Dbait, preferentemente, a través de un enlazador. Puede usarse cualquier enlazador conocido en la técnica para unir covalentemente la molécula que facilita la endocitosis a las moléculas Dbait. Por ejemplo, el documento WO09/126933 proporciona una revisión amplia de enlazadores convenientes, páginas 38-45. El enlazador puede ser de forma no exhaustiva, cadena alifática, poliéter, poliamina, poliamida, péptido, carbohidrato, lípido, polihidrocarburo, u otros compuestos poliméricos (por ejemplo, oligoetilenglicoles tales como los que tienen entre 2 y 10 unidades de etilenglicol, preferentemente, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 unidades de etilenglicol, aún con mayor preferencia 6 unidades de etilenglicol), así como también que incorporan cualquiera de los enlaces que pueden descomponerse por vía química o enzimática, tal como un enlace disulfuro, un enlace disulfuro protegido, un enlace lábil ácido (por ejemplo, enlace de hidrazona), un enlace éster, un enlace ortoéster, un enlace de fosfonamida, un enlace de péptido bioescindible, un enlace azo o un enlace de aldehído. Dichos enlazadores escindibles se detallan en el documento WO2007/040469 páginas 12-14, en el documento WO2008/022309 páginas 22-28.

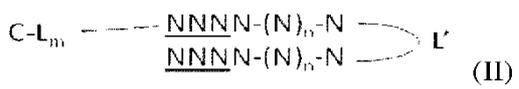
En un aspecto particular, la molécula Dbait puede unirse a una molécula que facilita la endocitosis. Alternativamente, varias moléculas que facilitan la endocitosis (por ejemplo, dos, tres o cuatro) pueden unirse a una molécula Dbait.

En un aspecto específico, el enlazador entre la molécula que facilita la endocitosis, en particular colesterol, y la molécula Dbait es CO-NH-(CH₂-CH₂-O)_n, en donde n es un número entero de 1 a 10, preferentemente, n se selecciona del grupo que consiste en 3, 4, 5 y 6. En un aspecto muy particular, el enlazador es CO-NH-(CH₂-CH₂-O)₄ (trietilenglicol carboxamido). El enlazador puede unirse a moléculas Dbait en cualquier posición conveniente que no modifica la actividad de las moléculas Dbait. En particular, el enlazador puede enlazarse en el extremo 5', en el extremo 3' o en el lazo cuando la molécula Dbait es una horquilla. Sin embargo, en el caso de una molécula Dbait en horquilla, los inventores descubrieron sorprendentemente que el colesterol enlazado a la molécula Dbait a través de un enlazador en su extremo 5' es más eficiente que el colesterol unido a la molécula Dbait a través de un enlazador en el lazo. Por lo tanto, en un aspecto preferido, la molécula Dbait conjugada contemplada es una molécula Dbait que tiene una estructura de horquilla y se conjuga a la molécula que facilita la endocitosis, preferentemente, a través de un enlazador, en su extremo 5'.

En otro aspecto específico, el enlazador entre la molécula que facilita la endocitosis, en particular colesterol, y la molécula Dbait es dialquilo-disulfuro {por ejemplo, (CH₂)_p-S-S-(CH₂)_q, donde p y q son números enteros de 1 a 10, preferentemente, de 3 a 8, por ejemplo, 6}.

En un aspecto más preferido, la molécula Dbait conjugada es una molécula de ácido nucleico en horquilla que comprende una porción o tallo bicatenario de ADN de 32 pb (por ejemplo, con una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID No 1-5, en particular la SEQ ID No 4) y un lazo que une las dos cadenas de la porción o tallo bicatenario de ADN que comprende o consiste en un enlazador seleccionado de hexaetilenglicol, tetradesoxitimidilato (T4) y 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxononadecano, los extremos libres de la porción o tallo bicatenario de ADN (es decir, en el lado opuesto del lazo) que tiene tres cadenas principales de fosfodiéster modificadas (en particular enlaces internucleotídicos de fosforotioato) y dicha molécula Dbait conjugada a un colesterol en su extremo 5', preferentemente, a través de un enlazador (por ejemplo, oligoetilenglicol carboxamido, preferentemente, trietilenglicol carboxamido).

La molécula Dbait conjugada o molécula de ácido nucleico en horquilla puede describirse, además, mediante las fórmulas:



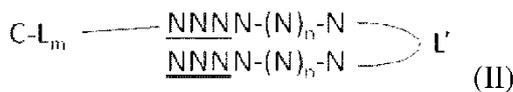
en donde N es un desoxinucleótido, n es un número entero de 21 a 95, la N subrayada se refiere a un nucleótido que tiene una cadena principal de fosfodiéster modificada, L' es un enlazador, C es una molécula que facilita la endocitosis y se selecciona del grupo que consiste en ácidos grasos octadecilo o dioleilo, folatos o ácido fólico y colesterol, L es un oligoetilenglicol carboxamido, m es 1. En la Fórmula (II), C-Lm se enlaza respectivamente al extremo 5' o extremo 3' del nucleótido. En la Fórmula (II), C-Lm se enlaza, preferentemente, a L' mediante un enlace disulfuro (S-S).

En aspectos preferidos, la molécula de la Fórmula (II) tiene una o varias de las siguientes características:

- N es un desoxinucleótido, preferentemente, seleccionado del grupo que consiste en A (adenina), C (citosina), T (timina) y G (guanina) y seleccionado para evitar la aparición de un dinucleótido CpG y para tener menos de 80 % o 70 %, incluso menos de 60 % o 50 % de identidad de secuencia con cualquier gen en un genoma humano; y/o,
- n es un número entero de 21 a 95, y aún con mayor preferencia, de 27 a 95. En un aspecto particularmente preferido, n es 27; y/o,
- la N subrayada se refiere a un nucleótido que tiene una cadena principal de fosforotioato o metilfosfonato, con mayor preferencia, una cadena principal de fosforotioato; y/o,
- el enlazador L' se selecciona del grupo que consiste en hexaetilenglicol, tetradexoitimidilato (T4) y 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano; y/o,
- m es 1 y L es un oligoetilenglicol carboxamido, con mayor preferencia, trietilenglicol carboxamido; y/o,
- C se selecciona del grupo que consiste en colesterol, octadecilo, dioleilo o folato, con mayor preferencia, es un colesterol.

Preferentemente, C-Lm es un radical (10-O-[1-propil-3-N-carbamilcolesteril]-trietilenglicol enlazador de trietilenglicol.

En un aspecto preferido, la molécula Dbait conjugada o la molécula de ácido nucleico en horquilla tienen la siguiente fórmula:

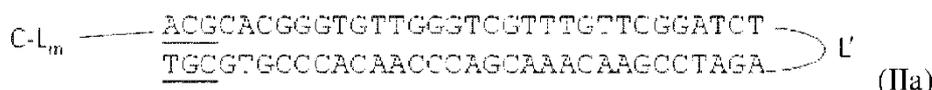


con la misma definición que la Fórmula (II) para N, subrayado N, n, L, L', C y m.

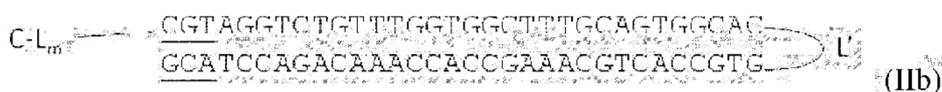
En un aspecto preferido, N=NNN-(N)n-N comprende al menos 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 o 32 nucleótidos consecutivos de Dbait32 (SEQ ID NO: 1), Dbait32Ha (SEQ ID NO: 2), Dbait32Hb (SEQ ID NO: 3), Dbait32Hc (SEQ ID NO: 4) o Dbait32Hd (SEQ ID NO: 5) o consiste en 20, 22, 24, 26, 28, 30 o 32 nucleótidos consecutivos de Dbait32 (SEQ ID NO: 1), Dbait32Ha (SEQ ID NO: 2), Dbait32Hb (SEQ ID NO: 3), Dbait32Hc (SEQ ID NO: 4) o Dbait32Hd (SEQ ID NO: 5). En un aspecto particular, NNNN-(N)n-N comprende o consiste en Dbait32 (SEQ ID NO: 1), Dbait32Ha (SEQ ID NO: 2), Dbait32Hb (SEQ ID NO: 3), Dbait32Hc (SEQ ID NO: 4) o Dbait32Hd (SEQ ID NO: 5), con mayor preferencia, Dbait32Hc (SEQ ID NO: 4).

En consecuencia, la molécula Dbait conjugada o la molécula de ácido nucleico en horquilla pueden seleccionarse del grupo que consiste en:

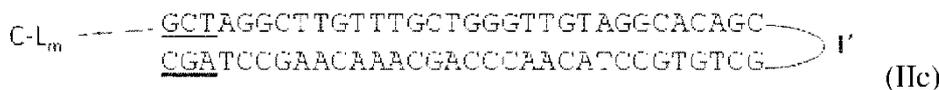
con NNNN-(N)n-N que es la SEQ ID NO: 1



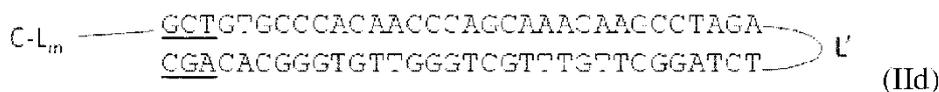
con NNNN-(N)n-N que es la SEQ ID NO: 2



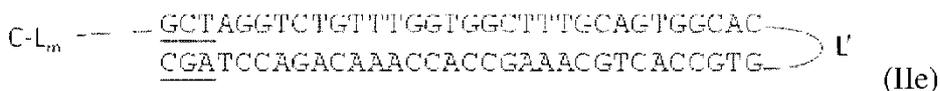
con NNNN-(N)n-N que es la SEQ ID NO: 3



con NNNN-(N)n-N que es la SEQ ID NO: 4



5 con NNNN-(N)_n-N que es la SEQ ID NO: 5 y



10 con la misma definición que las Fórmulas (I), (II) y (III) para L, L', C y m.

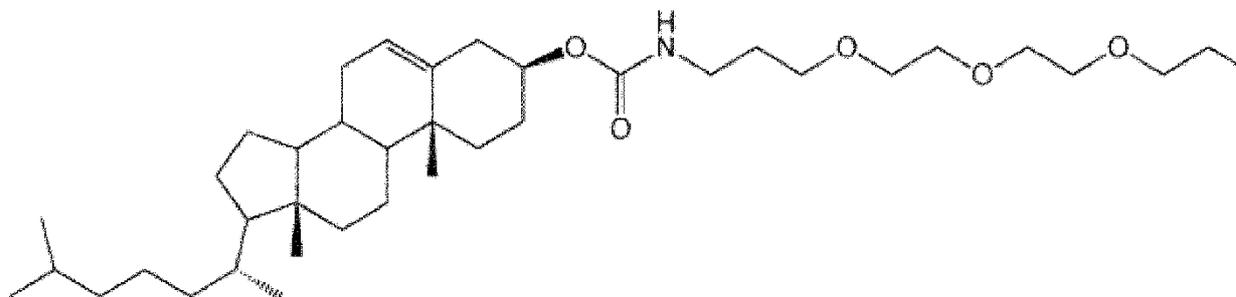
En aspectos preferidos, la molécula de las Fórmulas (II_a), (II_b (II_c), (II_d) y (II_e) tiene una o varias de las siguientes características:

- 15
- el nucleótido subrayado se refiere a un nucleótido que tiene o no una cadena principal de fosforotioato o metilfosfonato, con mayor preferencia, un nucleótido que tiene una cadena principal fosforotioato o metilfosfonato, aún con mayor preferencia, un nucleótido que tiene una cadena principal de fosforotioato; y/o,
 - el enlazador L' se selecciona del grupo que consiste en hexaetilenglicol, tetradesoxitimidilato (T4) y 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano; y/o,
 - m es 1 y L es un oligoetilenglicol carboxamido, con mayor preferencia, trietilenglicol carboxamido; y/o,
 - C se selecciona del grupo que consiste en un colesterol, octadecil, dioleoil o folato, con mayor preferencia, es un colesterol.

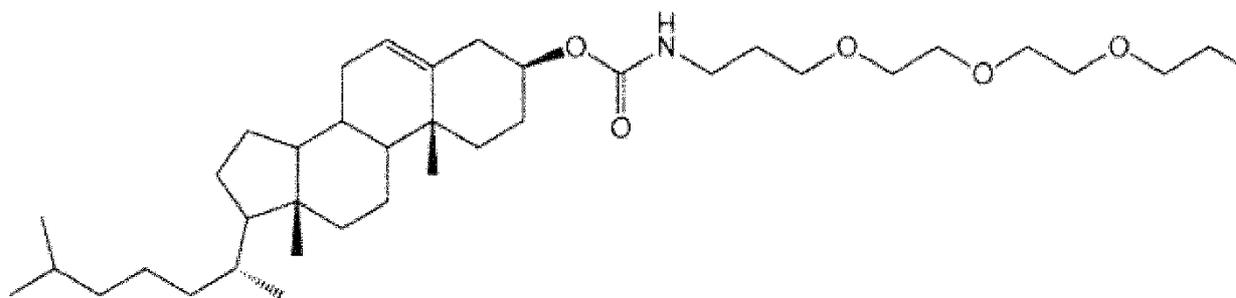
25 Preferentemente, C-L_m es un radical (10-O-[1-propil-3-N-carbamilcolesteril]-trietilenglicol enlazador de trietilenglicol.

En un aspecto específico de las moléculas Dbait o las moléculas de ácido nucleico en horquilla de las Fórmulas (II), (II_a), (II_b), (II_c), (II_d) y (II_e), L' se selecciona, preferentemente, del grupo que consiste en hexaetilenglicol, tetradesoxitimidilato (T4) y 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano.

30 En un aspecto específico de las moléculas Dbait o moléculas de ácido nucleico en horquilla de las Fórmulas (II), (II_a), (II_b), (II_c), (II_d) y (II_e), con C que es colesterol, C-L_m es el radical

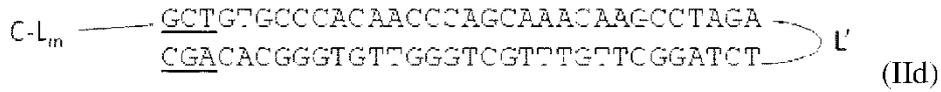


En un aspecto preferido, la molécula Dbait conjugada o la molécula de ácido nucleico en horquilla se selecciona del grupo que consiste en (II), (II_a), (II_b), (II_c), (II_d) y (II_e), en donde C-L_m es el radical

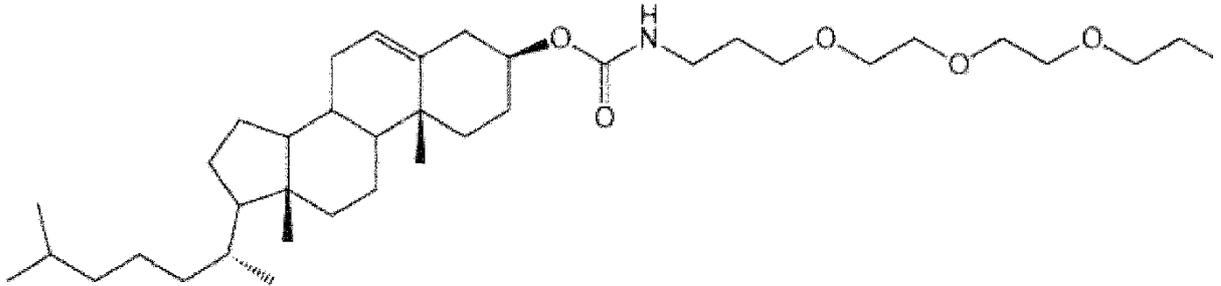


y en donde L' se selecciona, preferentemente, del grupo que consiste en hexaetilenglicol, tetradesoxitimidilato (T4) y 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano, con mayor preferencia, 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano.

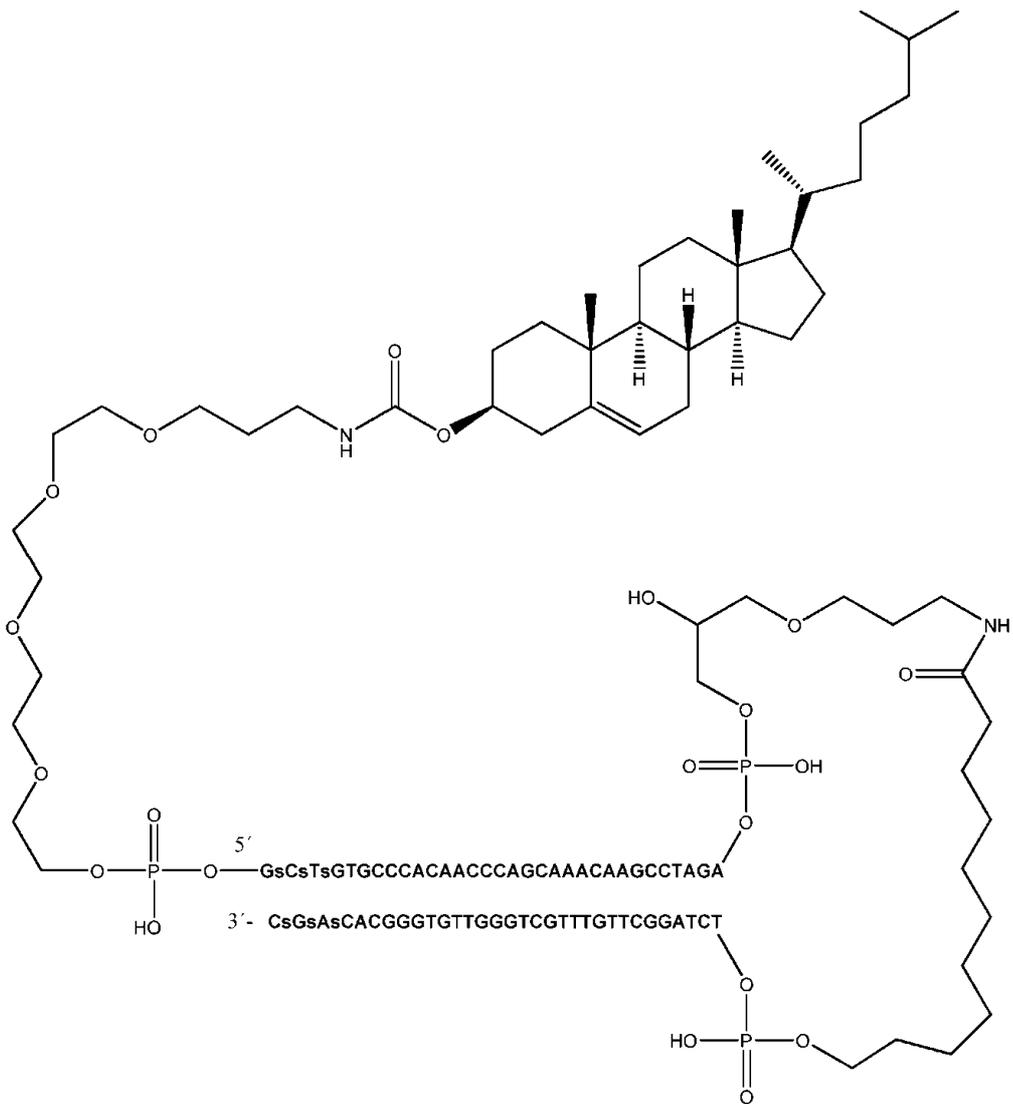
65 En una modalidad muy específica, la molécula Dbait o la molécula de ácido nucleico en horquilla tiene la siguiente fórmula



en donde C-L_m es el radical



20 en donde L' es 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano, y en donde los nucleótidos subrayados tienen una cadena principal de fosfortioato. En consecuencia, la molécula tiene la siguiente estructura y se hace referencia a esta en la sección de ejemplo como "coDbait".



65 Uno de los conjugados colesterol-Dbait, denominado DT01, es un oligodesoxirribonucleótido de 64 nt que consiste en dos cadenas de 32 nt de secuencia complementaria conectadas a través de un enlazador de 1,19-bis(fosfo)-8-hidraza-

Cánceres o tumores a tratar

5 Las composiciones farmacéuticas y los productos, kits o preparación combinada descritos en la descripción pueden usarse para tratar el cáncer en un sujeto.

10 Los términos “cáncer”, “canceroso”, o “maligno” se refieren a o describen el estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, por ejemplo, leucemia, linfoma, blastoma, carcinoma y sarcoma. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen leucemia
 15 mielode crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda positiva al cromosoma Filadelfia (Ph+ ALL), carcinoma de células escamosas, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cérvix, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon, y cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumor de células germinales, sarcoma pediátrico, asesino natural sinonasal, mieloma múltiple, leucemia mielogénica aguda (AML), leucemia linfocítica crónica, mastocitosis y cualquier síntoma asociado con la mastocitosis.

20 “Leucemia” se refiere a enfermedades malignas progresivas de los órganos formadores de sangre y se caracteriza generalmente por una proliferación y desarrollo distorsionados de leucocitos y sus precursores en la sangre y la médula ósea. La leucemia se clasifica generalmente clínicamente en base a (1) la duración y el carácter de la enfermedad: aguda o crónica; (2) el tipo de célula implicada; mielode (mielode), linfode (linfogenógeno), o monocítica; y (3) el aumento o no aumento en la cantidad de células anormales en la sangre: leucémica o aleucémica (subleucémica). La leucemia incluye, por ejemplo, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, leucemia granulocítica crónica, leucemia promielocítica aguda, leucemia de células T adultas, leucemia aleucémica, una leucemia leucocitémica, leucemia basófila, leucemia de blastocitos, leucemia bovina, leucemia mielocítica crónica, leucemia cutis, leucemia embrionaria, leucemia eosinófila, leucemia de Gross, leucemia de células pilosas, leucemia hemoblástica, leucemia hemocitoblástica, leucemia histiocítica, leucemia de células madre, leucemia monocítica aguda, leucemia leucopénica, leucemia linfática, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia
 25 linfógena, leucemia linfode, leucemia de células de linfosarcoma, leucemia de mastocitos, leucemia de megacariocitos, leucemia micromieloblástica, leucemia monocítica, leucemia mieloblástica, leucemia mielocítica, leucemia granulocítica mielode, leucemia mielomonocítica, leucemia Naegeli, leucemia de células plasmáticas, leucemia plasmacítica, leucemia promielocítica, leucemia de células de Rieder, leucemia de Schilling, leucemia de células madre, leucemia subleucémica y leucemia de células indiferenciadas. En determinados aspectos, la presente invención proporciona tratamiento para la leucemia mielode crónica, leucemia linfoblástica aguda, y/o leucemia linfoblástica aguda positiva al cromosoma Filadelfia (Ph+ ALL).

35 Diversos cánceres también se abarcan por el alcance de la invención, lo que incluye los siguientes: carcinoma que incluye los de vejiga (lo que incluye cáncer de vejiga acelerado y metastásico), mama, colon (lo que incluye cáncer colorrectal), riñón, hígado, pulmón (lo que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas y de células no pequeñas y adenocarcinoma de pulmón), ovario, próstata, testículos, tracto genitourinario, sistema linfático, recto, laringe, páncreas (lo que incluye carcinoma pancreático exocrino), esófago, estómago, vejiga biliar, cérvix, tiroides, y piel (lo que incluye carcinoma de células escamosas); tumores hematopoyéticos de linaje linfode lo que incluye leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkins, linfoma no Hodgkins, linfoma de células pilosas, linfoma histiocítico, y linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos de linaje mielode lo que incluye leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico, leucemia mielode, y leucemia promielocítica; tumores del sistema nervioso central y periférico, lo que incluye astrocitoma, neuroblastoma, glioma, y schwannomas; tumores de origen mesenquimal, lo que incluye fibrosarcoma, rabdomyosarcoma, y osteosarcoma; otros tumores, lo que incluye melanoma, xenoderma pigmentosum, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides, y teratocarcinoma; melanoma, melanoma maligno no extraíble en etapa III o IV, carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cérvix, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de
 40 mama, carcinoma de colon, y cáncer de cabeza y cuello, retinoblastoma, cáncer gástrico, tumor de células germinales, cáncer de huesos, tumores de huesos, histiocitoma fibroso maligno de hueso de adultos; histiocitoma fibroso maligno de hueso de infantes, sarcoma, sarcoma pediátrico, asesino natural sinonasal, neoplasmas, neoplasma de células plasmáticas; síndromes mielodisplásicos; neuroblastoma; tumor testicular de células germinales, melanoma intraocular, síndromes mielodisplásicos; enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, sarcoma sinovial.
 45 Adicionalmente, los trastornos incluyen urticaria pigmentosa, mastocitosis tales como mastocitosis cutánea difusa, mastocitoma solitario en humanos, así como también mastocitoma de perro y algunos subtipos raros como mastocitosis bullosa, eritrodérmica y teleangiectásica, mastocitosis con un trastorno hematológico asociado, tal como un síndrome mieloproliferativo o mielodisplásico o leucemia aguda, trastorno mieloproliferativo asociado con mastocitosis, leucemia de células cebadas, además de otros cánceres. Además, se incluyen otros cánceres dentro
 50 del alcance de los trastornos, lo que incluye los siguientes: carcinoma, lo que incluye los de vejiga, carcinoma urotelial, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cérvix, tiroides, testículos, en particular seminomas
 55
 60
 65

testiculares, y piel; lo que incluye carcinoma de células escamosas; tumores de estromas gastrointestinales (“GIST”); tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, lo que incluye leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkins, linfoma no Hodgkins, linfoma de células pilosas y linfoma de Burketts; tumores hematopoyéticos de linaje mielóide, lo que incluye leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimal, lo que incluye fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; otros tumores, lo que incluye melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, lo que incluye astrocitoma, neuroblastoma, glioma, y schwannomas; tumores de origen mesenquimal, lo que incluye fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, y osteosarcoma; y otros tumores, lo que incluye melanoma, xenoderma pigmentosum, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides, teratocarcinoma, tumores de células germinales no seminomatosas resistentes a quimioterapia, y sarcoma de Kaposi, y cualquier metástasis de estos.

En un aspecto preferido, el cáncer es un tumor sólido. El término “tumor sólido” significa especialmente cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon y generalmente del tracto GI (gastrointestinal), cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón, en particular cáncer de pulmón de células pequeñas, y cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer de próstata o sarcoma de Kaposi.

Las composiciones farmacéuticas y los productos, kits o preparaciones combinadas descritas en la invención pueden ser útiles para inhibir el crecimiento de tumores sólidos, disminuir el volumen tumoral, evitar la diseminación metastásica de tumores y el crecimiento o desarrollo de micrometástasis. Las composiciones farmacéuticas y los productos, kits o preparaciones combinadas descritas en la invención son adecuadas particularmente para el tratamiento de pacientes con mal pronóstico o de tumores radio o quimiorresistentes.

Los inventores analizaron una gran cantidad de diferentes tipos de tumores para cada tumor (lo que incluye melanomas, glioblastomas, carcinomas) a partir de líneas celulares y biopsias de los pacientes. Más del 80 % de ellos respondieron bien al tratamiento. En particular, se ha observado eficiencia para los siguientes tipos tumorales: melanoma, glioblastoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado y cáncer de cabeza y cuello.

En un aspecto preferido, el cáncer puede seleccionarse de melanoma, glioblastoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado y cáncer de cabeza y cuello.

Régimen, dosis y rutas de administración

La dosificación eficaz de cada una de las parejas de combinación empleadas en la preparación combinada de la invención puede variar en dependencia del compuesto o composición farmacéutica en particular empleada, el modo de administración, la afección que se trata, la gravedad de la afección que se trata. Por lo tanto, el régimen de dosificación de la preparación combinada de la invención se selecciona de acuerdo con una variedad de factores, lo que incluye la vía de administración y el estado del paciente. Un médico, un clínico o un veterinario experto puede determinar y recetar fácilmente la cantidad eficaz de los ingredientes activos individuales necesarios para prevenir, contrarrestar o detener el progreso de la afección. La precisión óptima para lograr la concentración de los ingredientes activos dentro del intervalo que produce eficacia sin toxicidad requiere un régimen basado en la cinética de la disponibilidad de los ingredientes activos en los sitios objetivo.

La vía de administración para las moléculas Dbait conjugadas puede ser oral, parenteral, intravenosa, intratumoral, subcutánea, intracraneal, intratumoral, tópica, rectal, transdérmica, intradérmica, nasal, intramuscular, intraperitoneal e intraósea. En un aspecto preferido, las moléculas Dbait conjugadas deben administrarse o inyectarse cerca del o los sitios tumorales a tratar.

La vía de administración para el agente antitumoral que daña el ADN puede ser oral, parenteral, intravenosa, intratumoral, subcutánea, intracraneal, intraarterial, tópica, rectal, transdérmica, intradérmica, nasal, intramuscular, intraósea.

Una vez que ha comenzado el tratamiento con radioterapia o con el agente antitumoral que daña el ADN, el tratamiento con las moléculas Dbait conjugadas puede continuar mientras el tratamiento mediante radioterapia o con el agente antitumoral que daña el ADN se aplique o administre. Alternativamente, el tratamiento con las moléculas Dbait conjugadas también puede finalizar.

Para las moléculas Dbait conjugadas, la dosificación eficaz del agente antitumoral que daña el ADN empleado en la preparación, kit o producto combinados de la invención puede variar en dependencia del modo de administración, la afección que se trata, la gravedad de la afección que se trata. Por lo tanto, el régimen de dosificación de las moléculas Dbait conjugadas se selecciona de acuerdo con una variedad de factores, lo que incluye la vía de administración y el estado del paciente. Un médico, un clínico o un veterinario experto puede determinar y recetar fácilmente la cantidad eficaz de las moléculas Dbait conjugadas necesaria para prevenir, contrarrestar o detener el progreso del cáncer, en particular, en combinación con el tratamiento que daña el ADN seleccionado.

Por ejemplo, para la administración local (por ejemplo, cuando se usa la administración intratumoral o subcutánea), la cantidad eficiente de las moléculas Dbait conjugadas es al menos 0,01 mg por 1 cm³ de tumor, preferentemente, 0,1 - 40 mg por 1 cm³ de tumor, con la máxima preferencia, 1 - 20 mg por 1 cm³ de tumor. La cantidad eficiente puede administrarse en un protocolo de tratamiento diario (por ejemplo, 5 días por semana durante 3 a 6 semanas consecutivas o 3 veces por semana durante 3 a 6 semanas consecutivas). Alternativamente, una cantidad eficiente de al menos 0,1 mg por 1 cm³ de tumor, preferentemente, 0,1 - 40 mg por 1 cm³ de tumor, con la máxima preferencia, 1 - 20 mg por 1 cm³ de tumor, puede administrarse en un protocolo de tratamiento semanal durante 3-6 semanas consecutivas, por ejemplo. Cuando se usan otras rutas de administración, un experto en la técnica puede adaptar la cantidad para obtener una cantidad eficiente de las moléculas Dbait conjugadas en el tumor de al menos 0,01 mg por 1 cm³ de tumor, preferentemente, 0,1 - 40 mg por 1 cm³ de tumor, con la máxima preferencia, 1 - 20 mg por 1 cm³ de tumor, en particular en un protocolo de tratamiento diario o en un protocolo de tratamiento semanal. Por ejemplo, para una ruta sistémica, la cantidad eficiente o dosificación unitaria de las moléculas Dbait conjugadas puede ser de 0,1 a 100 mg, preferentemente, de 4 a 40 mg. En consecuencia, para una ruta sistémica, la cantidad eficiente o dosificación unitaria de las moléculas Dbait conjugadas puede ser de 0,06 a 0,6 mg/kg de paciente. Por supuesto, la dosificación y el régimen pueden adaptarse por un experto en la técnica en consideración del régimen de quimioterapia y/o radioterapia. Para la radioterapia, puede usarse cualquier régimen de radioterapia conocido en la técnica, en particular la radiación estereotáxica (por ejemplo, 15 Gy) o una irradiación fraccionada. El uso de una irradiación fraccionada puede ser particularmente eficiente, por ejemplo, puede aplicarse radiación cada día o cada 2-5 días, preferentemente, cada 3-4 días, en un período de una, dos, tres, cuatro, cinco o seis semanas. La irradiación puede ser de 1 a 10 Gy, preferentemente, de 2 a 5 Gy, en particular 2, 3, 4 o 5 Gy. Por ejemplo, puede contemplarse la irradiación fraccionada de 15x2 Gy en seis semanas, o de 4 a 6x5 Gy en dos semanas. En un aspecto preferido, la radioterapia contemplada es un protocolo con 4 irradiaciones de 5 Gy en dos semanas. Diferentes regímenes o condiciones de tratamientos combinados del cáncer con irradiación y moléculas Dbait se han evaluado y permiten demostrar que la radiosensibilización de tumores por moléculas Dbait depende de las dosis de moléculas Dbait pero no de las dosis de irradiación.

Para la quimioterapia, la dosificación eficaz del agente antitumoral que daña el ADN empleado en la preparación, el kit o el producto combinados de la invención o en combinación con la composición de la invención puede variar en dependencia del agente antitumoral que daña el ADN en particular empleado, el modo de administración, la afección que se trata, la gravedad de la afección que se trata. Por lo tanto, el régimen de dosificación del agente antitumoral que daña el ADN se selecciona de acuerdo con una variedad de factores, lo que incluye la vía de administración y el estado del paciente. Un médico, un clínico o un veterinario experto puede determinar y recetar fácilmente la cantidad eficaz del agente antitumoral que daña el ADN necesaria para prevenir, contrarrestar o detener el progreso del cáncer.

El tratamiento puede incluir uno o varios ciclos, por ejemplo, de dos a diez ciclos, en particular dos, tres, cuatro o cinco ciclos. Los ciclos pueden ser continuos o separados. Por ejemplo, cada ciclo se separa por un período de tiempo de una a ocho semanas, preferentemente, de tres a cuatro semanas.

Ejemplos

Una comparación multiescala de distribución y actividad de ADN corto (Dbait) en complejo con polietilenimina (PEI) o unido al colesterol.

Caracterización de los complejos Dbait/vector y captación celular

Se ha demostrado que la PEI es capaz de formar complejos de interpolielectrolitos no covalentes con ADN, oligonucleótidos y ARN. Las cadenas de PEI largas son altamente eficaces en la transfección génica, pero más citotóxicas. Los inventores evaluaron varios poliplexos de partículas de PEI con Dbait y compararon su actividad con respecto a una Dbait modificada unida covalentemente al colesterol (denominada coDbait). La coDbait fue una molécula Dbait unida covalentemente a una cadena grasa de colesterol que se usó sin vector adicional. Para cada vector analizado, el objetivo principal de los inventores fue desarrollar una formulación con la distribución de tamaño de partículas más homogénea a la concentración de Dbait más alta. El diámetro y la carga superficial de las partículas se midieron mediante dispersión dinámica de luz láser (DLS). Mediante el uso de un análisis multimodal, los inventores encontraron que la PEI ramificada (bPEI25K) con un tamaño medio de 25Kd y PEI lineal con tamaño 22Kd (PEI22K) o 11Kd (PEI11K) formó complejos con propiedades similares (Tabla 1).

Tabla 1. Fluorescencia y captación celular de Dbait formulada

	Moléculas/Métodos	Cloroquina (100 mg/ml)	Dbait (µg/ml)	fluorescencia ^a x10e-6 /µg/ml	MCC ^b 5 horas	cor MCC ^c 5 horas	MCC ^b 24 horas	MCC ^c 24 horas
5	-	-	-	0	2,78	ND	3,2	ND
10	cloroquina	+	-	0	3,12			
	Electroporación	-	1,6	6,17	8,72	1,41	10,79	1,75
	Electroporación	+	16	6,17	8,6	1,39	ND	ND
15	Dbait	-	1,6	6	2,65	0,43	3,45	0,56
	Dbait/PEI11K	-	1,6	1,92	26,46	13,78	13,26	6,91
	Dbait/bPEI25K	-	1,6	3,04	51,62	16,98	57,98	19,07
20	Dbait/PEI22K	-	1,6	3,32	54,49	16,41	42,74	12,87
	Dbait/Superfect	-	1,6	6,41	220	34,32	203,78	31,79
	Dbait/Superfect + CQ	+	1,6	6,41	218	34,01	ND	ND
25	coDbait	-	1,6	3,47	10,02	2,89	ND	ND
	coDbait + CQ	+	1,6	3,47	20,71	5,97	ND	ND
	coDbait	-	16	3,47	65,74	18,95	64	18,44
30	coDbait + CQ	+	16	3,47	236,43	68,14	214,3	61,76
	coDbait	-	32	3,47	145	41,79	ND	ND
	coDbait + CQ	+	32	3,47	390,38	112,50	ND	ND
35	^a fluorescencia en valor FL2; ^b MCC= valor FL2 medio del contenido celular (>3 experimentos); ^c cor MCC = FL2/fluorescencia corregida de contenido celular							

Se analizaron diferentes relaciones de PEI en Dbait. La relación más baja que conduce al complejo Dbait al 100 % se determinó mediante ensayo de cambio de gel. La relación N/P de 6, 6 y 9 se eligió respectivamente para PEI11K, PEI22K y bPEI25K para estudios adicionales. Las partículas del complejo Dbait-PEI fueron estables durante un período de una hora en sacarosa al 10 %. La morfología altamente homogénea de partículas esféricas en la población (con un tamaño que variaba de 125 a 140 nm) se confirmó por microscopía electrónica de transmisión (Figura 1A). La presencia de sal en el tampón de dilución con concentración que excede 0,8 mg/ml, o el almacenamiento prolongado, indujo la agregación de complejos de PEI. Los complejos con Superfect (60 µg de Superfect/µg Dbait) que proporcionaron agregados más grandes y polidispersos (>2 µm) se usaron como un control positivo. El copolímero anfifílico no cargado Lutrol no formó un complejo de interacción estable con Dbait y se usó como control negativo en algunos experimentos.

Los inventores controlaron la captación celular de los diferentes complejos mediante el uso de una Dbait modificada por cy3 fluorescente. La fluorescencia inicial del complejo cy3-Dbait se monitoreó inmediatamente antes de la transfección. En los complejos de PEI, la fluorescencia de Dbait se redujo de 2 a 3 veces lo que indica que la compactación de las moléculas con PEI podría apagar la fluorescencia (Tabla 1). coDbait también fue menos fluorescente que la Dbait desnuda lo que indica que el colesterol podría interactuar con la cianina en la misma molécula. Superfect o Lutrol no afectaron la fluorescencia. El contenido celular de células de fibroblastos transfectadas humanas se midió mediante análisis de citometría de flujo. La distribución de la fluorescencia de las células tratadas con la mezcla de Dbait desnuda o la mezcla Dbait-Lutrol no fue diferente del control no tratado lo que indica que las moléculas Dbait no entraron espontáneamente en las células. La electroporación fue relativamente ineficiente y el aumento de la concentración de Dbait no mejoró la eficiencia de la transfección. Todos los polímeros policationicos (PEI y Superfect) promovieron una captación celular eficiente, pero las PEI lineales mostraron una distribución más amplia que los complejos Dbait/Superfect o Dbait/PEIb25K. La coDbait entró a las células sin la ayuda de factores de transfección, pero con una eficiencia 10 veces menor que Dbait/PEI. El aumento de 10-15 veces la concentración de coDbait permitió una transfección eficiente (Figura 1B).

Una limitación de la eficiencia de transferencia de ADN es su retención en endosomas lo que impide que interactúe con su objetivo o que se transcriba. En la célula, el ADN debe escapar de las vías endosómicas normales, que conduce a la degradación. Por lo tanto, la eficiencia del suministro de ADN se correlaciona no solo con la captación celular,

sino también con la desestabilización y escape de los endosomas. Se conoce que la PEI tiene una capacidad tampón alta que facilita la liberación de ADN de endosomas y lisosomas ("hipótesis de la esponja de protones"). Por el contrario, coDbait requerirá la ayuda de agentes fusogénicos tales como la cloroquina (CQ), para liberarse de manera eficiente de los endosomas. Con vistas a mejorar la eficiencia de la transfección, añadimos 100 μ M de CQ a las células media hora antes de la transfección. La CQ aumentó por 2-4 veces la captación celular de coDbait (Figura 1). La cantidad de Dbait liberada en la célula se monitoreó por la activación de la quinasa de ADN-PKcs desencadenada por su unión a las moléculas Dbait (Quanz y otros, 2009, supra). La adición de colesterol no afectó la capacidad de Dbait para activar el ADN-PK purificado (Figura 2A). En la célula, la activación de la ADN-PKcs cinasa se monitoreó por la cantidad de fosforilación de H2AX que se demostró que es estrictamente dependiente de ADN-PK. Tanto Dbait/PEI como coDbait indujeron fosforilación de H2AX en las células tratadas (Figura 2B). Los complejos PEI/Dbait ramificados y lineales promueven rápidamente la fosforilación de H2AX (Figura 2C) que alcanzó el máximo 6 horas después del inicio de la transfección y se mantuvo 24 horas después de la transfección. La actividad cinasa inducida por Dbait fue muy baja después de la electroporación en cualquier momento (Figura 2). Altas concentraciones de CoDbait fueron muy ineficientes para H2AX fosforilado, y requirieron al menos 24 horas para alcanzar el valor máximo. La adición de CQ durante la transfección aumentó la activación de ADN-PKcs en células transfectadas con coDbait hasta que se observó con 10 veces menos Dbait/PEI (Figura 2C). CQ no aumentó la actividad en las células transfectadas con Dbait/PEI lo que indican que Dbait se libera eficientemente de los endosomas cuando forma complejo con PEI. Dado que la captación celular de coDbait no aumentó entre 5 horas y 24 horas después de la transfección, la activación lenta de ADN-PK por coDbait revela su liberación lenta de los endosomas.

Captación celular y toxicidad general en embriones tempranos de pez cebra

Analizar la captación de Dbait y la actividad en cultivos celulares no permite hacer conclusiones acerca de la difusión del fármaco, la captación celular y la actividad en todo el organismo. Los inventores evaluaron este problema mediante la inyección de Dbait-cy3, ya sea desnudo o con adyuvante, en el espacio intercelular de 1000 embriones de pez zebra en el estadio de célula (estadio 1K) (Kimmel y otros, 1995, Dev Dyn 203:253-310). Este protocolo permitió la observación in vivo por microscopía confocal de la distribución de Dbait-cy3 a nivel celular y subcelular así como también su actividad sobre las células en división rápida del embrión temprano de pez cebra. La Dbait-cy3 desnuda inyectada en el polo animal de embriones en el estadio 1K se difundió rápidamente a lo largo de todo el blastodermo y ya no se detectaron a los 15 minutos después de la inyección. La adición de Lutrol permitió la retención de Dbait en el espacio extracelular alrededor del punto de inyección pero no facilitó la captación celular. En presencia de Superfect o PEI, se observaron numerosos parches fluorescentes dentro de las células lo que indicó una captación celular eficiente. coDbait cy3 mostró otro tipo de comportamiento con una tinción fuerte y persistente de las membranas plasmáticas junto con fluorescencia intracelular en los parches. La incubación de embriones con CQ antes de la inyección convirtió los parches fluorescentes grandes de coDbait en una distribución intracelular difusa.

La observación de los efectos fenotípicos 20 horas después de la inyección permitió evaluar la actividad de Dbait y la toxicidad total del tratamiento. La fluorescencia de Dbait se detectó 24 horas después de la inyección en las células de la cabeza de las larvas (Fig. 3A-C), que de acuerdo con el desarrollo del mapa de destino del pez cebra (Woo y otros, 1995, Curr Opin Genet Dev 5:439-443) se derivó del área inyectada en el polo animal de embriones de pregastrulación. La inyección de Dbait sin adyuvante (NA) o combinado con Lutrol (Lu) no mostró efecto sobre el desarrollo (Figura 3D) lo que se correlaciona con la pobre captación intracelular de Dbait descrita anteriormente. La adición del adyuvante condujo a la muerte celular en la cabeza y en correlación con el volumen inyectado, pudo observarse muerte celular extensa y teratogénesis. Los fenotipos de 24 horas se clasificaron como se describió (Figura 3), lo que permite cuantificar la toxicidad de la mezcla inyectada. Para la misma concentración del Dbait, aparecieron evidentes diferencias en términos de muerte celular y alteraciones posteriores del desarrollo, en dependencia del adyuvante. La adición de Superfect (sup) fue muy tóxica para las células embrionarias y la muerte celular extensa en estadios tempranos resultó en un alto porcentaje de fenotipos de tipo 2. De manera similar, la adición de PEI (25K, 22K, 11K) demostró ser tóxica para los blastómeros de pez cebra. Aunque menos eficiente que la adición de PEI, la inyección de coDbait resultó en una muerte celular significativa. La preincubación de los embriones con CQ no aumentó significativamente la toxicidad. En conjunto, la muerte temprana de las células embrionarias y las posteriores anomalías del desarrollo fue un protocolo rápido y confiable para evaluar la toxicidad general de Dbait +/-adyuvante en embriones de pez cebra. La correlación de la muerte celular con la captación celular sugiere que la actividad antitumoral del Dbait en células embrionarias podría desempeñar un papel importante en el efecto tóxico.

Toxicidad local y sistémica en ratones

Para evaluar la consistencia de los datos de cultivo celular, embriones de pez cebra y ratón, los inventores analizaron la tolerancia de la piel de ratones desnudos a la administración repetida de Dbait/PEI1K, Dbait/PEI22K, Dbait/bPEI25K y coDbait. La toxicidad de las Dbait formuladas diferentemente se analizó después de 3 inyecciones subcutáneas diarias (SC). Todos los Dbait/PEI mostraron alta toxicidad con inyecciones que se toleraron a 3,75 mg/kg, pero comenzaron a los 5 mg/kg a desencadenar la inflamación local asociada con necrosis local e isquemia que desapareció rápidamente con la detención del tratamiento. La toxicidad por inyección intravenosa (IV) dio resultados similares: las inyecciones intravenosas de Dbait/PEI fueron letales a 3 mg/kg con muerte que se produjo durante la inyección probablemente por obstrucción de la sangre. Las inyecciones lentas mediante perfusión (0,4 μ l/mn) aumentaron la tolerancia hasta 6 mg/kg de Dbait/PEI (6 nmoles/inyección) lo que confirma que la mayoría de la

toxicidad IV se debe a la concentración local en el sitio de inyección del bolo. coDbait con o sin CQ no mostró toxicidad en todas las dosis analizadas (hasta 800 mg/kg/inyección; 800 nmoles/inyección) independientemente de la vía usada: SC, bolo IV o perfusión IV.

5 Actividad antitumoral en tumores xenoinjertados

El efecto antitumoral de la Dbait formulada se probó en combinación con radioterapia en melanoma humano xenoinjertado SK28. Los complejos Dbait/vector se administraron 5 horas antes de cada irradiación mediante el uso de inyecciones intratumorales.

10

Aunque la administración de fármacos por inyección intratumoral (IT) se ha usado en muchos ensayos, se aconseja actualmente evitar esa vía de administración en ensayos clínicos. Los inventores investigaron cómo Dbait/PEI11k o coDbait podrían administrarse por inyección subcutánea (SC) en el área cercana al tumor. Varios ensayos clínicos han usado exitosamente esta vía de administración. Los inventores compararon en primer lugar la difusión de las moléculas en los tumores tratados mediante una inyección intratumoral o dos inyecciones subcutáneas realizadas en lados opuestos del tumor (Figura 4). La Dbait fluorescente, en complejo con PEI11k, tendió a formar agregados en el sitio de inyección y se difundió progresivamente hasta el límite del tumor. Por el contrario, coDbait mostró una distribución más uniforme alrededor de la inyección ya sea dentro del tumor o en su cercanía. Las inyecciones SC de Dbait/PEI11k o coDbait fueron ligeramente menos eficientes que las inyecciones IT en términos de control del crecimiento tumoral (Tabla 2). Sin embargo, aumentar la cantidad de sitios de inyección debería permitir mejorar significativamente el control del crecimiento tumoral sin añadir toxicidad local.

15

20

Tabla 2. Supervivencia de ratones con xenoinjertos después de la irradiación asociada con diversos tratamientos

25	Complejos Dbait/vector	Concentración de Dbait	modo de administración ^a	Núm. Ratones curados ^b	Mediana del tiempo de supervivencia	Riesgo relativo (valor p)	Media de TGD	SD de TGD	% medio de TGD ^c	
30	Simulado	-	IT	79	2	72	-	11	15	160
	Dbait	6 x 60µg (3 nmol)	IT	6	0	63	1,40 (p<0,41)	3	8	114
35	Dbait/PEI11k	6 x 60µg (3 nmol)	IT	38	3	123	0,26 (p<2,69.10-8)	>40	27	313
	Dbait/PEI22k	6 x 60µg (3 nmol)	IT	10	2	>150	0,09 (p<4,62.10-6)	>63	40	436
40	Dbait/PEIb25k	6 x 60µg (3 nmol)	IT	19	4	>150	0,13 (p<3,73.10-8)	>60	35	419
45	Dbait/Lutrol	6 x 60µg (3 nmol)	IT	10	0	72	1,2 (p<0,56)	5	5	128
	Dbait/PEI11k	6 x 150µg (7,5 nmol)	SC	12	0	135	0,34 (p<1,05.10-3)	22	15	216
50	CQ	-	IT	6	0	68	-	8	6	142
	coDbait+CQ	6 x 600µg (30 nmol)	IT	13	0	98	0,23 (p<4,02.10-4)	42	25	323
55	coDbait+CQ	6 x 1,2 mg (60 nmol)	SC	16	0	101	0,22 (p<1,05.10-3)	>22	23	218

^amodo de administración: IT, intratumoral; SC, subcutánea

^blos ratones curados son animales sin recurrencia dentro de 300 días después del tratamiento

^cel cálculo del TGD y el análisis estadístico se describen en Materiales y Métodos

60

Se ha estudiado la supervivencia de cinco grupos de ratones desnudos que portan xenoinjerto de melanoma SK28. Grupo 1) ratones no tratados (n=16); Grupo 2) ratones irradiados (IR, n=12); Grupo 3) ratones irradiados con 1 mg de cloroquina inyectada por vía intraperitoneal (CQ, IR, n= 10); Grupo 4) ratones tratados con 0,6 mg de DT01

65

inyectado por vía intratumoral (también denominado coDbait) e irradiados 5 horas más tarde (DT01, IR, n=11); y Grupo 5) ratones tratados previamente con 1 mg de cloroquina inyectado por vía intraperitoneal 2 horas antes de la inyección intratumoral de 0,6 mg de DT01 (también denominado voDbait) e irradiados 5 horas más tarde (DT01, CQ, IR, n=13).

5

Los resultados se presentan en la Figura 5.

Con 0,6 mg de coDbait administrado intratumoralmente, el pretratamiento con cloroquina radiosensibilizó notablemente y aumentó la supervivencia (grupo 5) en comparación con la radioterapia sola (grupo 2), mientras que ni coDbait (grupo 4) ni CQ (grupo 3) mostraron una radiosensibilización significativa. El grado de radiosensibilización del grupo 5 fue similar al del grupo tratado con 0,06 mg de Dbait formulada con polietilenimina (PEI) en una relación N/P=6.

10

Un régimen de administración basado en una inyección subcutánea de coDbait también se ha evaluado en ratones desnudos que portan xenoinjerto de melanoma SK28. Este régimen se describe esquemáticamente en la Figura 6. En resumen, este régimen incluye cuatro tratamientos combinados con coDbait e irradiación en dos semanas. En particular, 4 mg de coDbait se inyectaron por vía subcutánea en dos puntos opuestos separados por 5 mm del límite del tumor. Además, los animales se trataron previamente con 1 mg de cloroquina (CQ) y se trataron posteriormente con CQ con la misma dosificación durante el tratamiento con coDbait e irradiación. El crecimiento tumoral se evaluó después de este régimen de administración y los resultados se proporcionan en la Figura 6.

15

20

Se ha observado que el menor crecimiento tumoral se observa con el cotratamiento de coDbait e irradiación con cloroquina después de un tratamiento previo con cloroquina. Además, el grupo cotratado con cloroquina mostró resultados más homogéneos que aquellos sin tratamiento con cloroquina.

25

Conclusión

En el presente estudio, los inventores usaron un conjunto de ensayos para guiar el desarrollo de protocolos de administración y formulación de fármacos. Estos ensayos permitieron comparar diferentes formulaciones de Dbait antes de realizar ensayos preclínicos en ratones. Se usaron ensayos celulares y de embriones de pez cebra para evaluar la eficiencia de la captación celular de Dbait, una etapa requerida previamente en el efecto del fármaco antitumoral, y seleccionar los protocolos y formulaciones más apropiados para los estudios preclínicos en mamíferos. La toxicidad general en el embrión de pez cebra no se correlacionó con la toxicidad en la piel de los ratones o después de la inyección sistémica. En particular, la alta toxicidad de coDbait en el embrión de pez cebra indicó que la mayoría de las células que entraron en contacto con el fármaco probablemente murieron mientras que la piel de los ratones no mostró ninguna reacción a las inyecciones de coDbait a altas dosis. Esta diferencia sugiere que la toxicidad en el embrión temprano de pez cebra es un indicador de sensibilidad tumoral en lugar de sensibilidad del tejido saludable. En realidad, se ha demostrado que las moléculas Dbait son específicamente tóxicas en tumores pero no en piel normal (Quanz y otros, 2009, supra). Dbait/PEI (5 μ M) y coDbait (50 μ M) + CQ que desencadenaron una activación de ADN-PKcs comparable en cultivo celular tuvieron un efecto tóxico similar sobre los embriones de pez cebra (Figura 3D) y mostraron actividad antitumoral significativa en tumores de ratón (Tabla 2, Figuras 5 y 6). Esta observación es consistente con la sensibilidad a la actividad antitumoral de células embrionarias de pez cebra que comparten propiedades características con las células tumorales, lo que incluye índices mitóticos y rasgos bioquímicos y fenotípicos. De acuerdo con esta hipótesis, los inventores demostraron recientemente la actividad antiproliferante de Dbait mediante la inyección intracelular directa de Dbait desnuda en blastómeros de pez cebra entre los estadios de 1 y 16 células.

30

35

40

45

Los polímeros de PEI se evaluaron entre todas las moléculas adyuvantes analizadas como los más eficientes en la formación de complejos con Dbait. Sin embargo, su uso se limitó por su toxicidad sobre los tejidos así como también en el sistema sanguíneo. La toxicidad local se superó parcialmente por la administración lenta (perfusión) y mediante la división de las dosis inyectadas en sitios de inyección diferentes. Pero la combinación covalente de colesterol y Dbait proporcionó la mejor alternativa para el suministro de Dbait a las células sin adición de adyuvante. De hecho, la ausencia de toxicidad dentro del intervalo de dosis probadas sugiere que esta molécula podría resultar útil a pesar de las dosis más altas requeridas para el efecto antitumoral. Las dosis de 3 nmoles y 30 nmoles por inyección de Dbait/PEI11K respectivamente y coDbait duplicaron el retraso en el crecimiento tumoral inducido por la irradiación sola. La toxicidad respectiva de ambas formulaciones (6 nmoles y >800 nmoles) proporcionó una relación relativa de dosis eficiente/dosis de toxicidad de 0,5 para Dbait/PEI11K y < 0,037 para coDbait, lo que indica que coDbait es un candidato muy bueno para el ensayo clínico.

50

55

60

Materiales y Métodos

Formación de Dbait y partículas

Las moléculas Dbait y coDbait se obtuvieron mediante síntesis de oligonucleótidos en fase sólida automatizada de Eurogentec (Seraing, Bélgica) o de Agilent Technologies Nucleic Acid Solutions Division (Boulder, EE.UU.) como se describió anteriormente (Quanz y otros, 2009, supra). Estas se purificaron mediante HPLC de fase inversa

65

desnaturalizante y/o HPLC-IEX. Algunos derivados de Dbait se etiquetaron con los fluoróforos Cy3 ($\lambda_{\text{excitación}} = 540$ nm; $\lambda_{\text{emisión}} = 560$ nm) o Cy5.5 ($\lambda_{\text{excitación}} = X$ nm; $\lambda_{\text{emisión}} = X$ nm). Las PEI lineales (11 kDa y 22 kDa) fueron de Polyplus-Transfection (Illkirch, Francia) y se proporcionaron como una solución lista para usar de concentración de nitrógeno 300 μM . La bPEI25kd ramificada se adquirió de SIGMA-Aldrich (Saint Quentin, Francia). El Lutrol se adquirió de In Cell Art (Nantes, Francia). Las soluciones de Dbait e PEI (PEI de reserva) se diluyeron en sacarosa al 10 % o NaCl 150 mM (para experimentos de transfección in vitro) para obtener diversas relaciones de vector/Dbait. La relación de PEI/Dbait (o relación N/P) se determinó de acuerdo con la cantidad de nitrógeno de amina para PEI y fosfato para Dbait. Típicamente, para 300 μl de complejos a 0,6 mg/ml y N/P 6, Dbait (180 μg , 0,54 μmol de fosfato) y la cantidad deseada de solución polimérica (11,4 μl de solución madre de PEI contienen 0,3 μmol de nitrógeno de amina) se diluyeron cada uno en 150 μl (sacarosa al 10 %). Las partículas de Superfect/Dbait se prepararon de acuerdo con el fabricante (Qiagen, Courtaboeuf, Francia) en una relación de 10 (μl de Superfect por μg de ADN. La complejación del vector/Dbait se analizó mediante el método de electroforesis en gel de agarosa. Las muestras (18 μl) se mezclaron con colorante azul de bromofenol (1 μl) y después se cargaron en gel de agarosa al 1,5 % en la cámara de electroforesis que contiene el tampón TAE IX (Tris-acetato 40 mM, pH 8,3, EDTA 1 mM). El gel se corrió a 100 Volts durante 30 min. A continuación, el gel se tiñó con bromuro de etidio (EtBr) durante 15 minutos y las bandas se observaron con luz UV.

Cultivo celular, moléculas Dbait y transfección

Las moléculas Dbait se produjeron mediante síntesis de oligonucleótidos en fase sólida automatizada. La secuencia es 5'-GCTGT- GCCCACAACCCAGCAAACAAGCCTAGA-(H)-TCTAGGCTTG TTTGCTGGGTTGTGGGCACAGC (SEQ ID NO: 4) donde H es un enlazador de hexaetilenglicol. Los estudios en células en cultivo se realizaron mediante el uso de fibroblastos MRC-5 transformados con SV40. Las células se cultivaron a 37 °C en cultivos monocapa en DMEM completo (Gibco, Cergy Pontoise, Francia) con FCS al 10 % y antibióticos (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de penicilina) en condiciones de 100 % de humedad, 95 % de aire y 5 % de CO₂. A menos que se especifique de cualquier otra manera, las transfecciones se realizaron en 1,2 ml de medio MEM sin suero en placas de 60 mm de diámetro. La transfección con jetPEI (Polyplus-transfección, Illkirch, Francia) se realizó en una relación N/P de 6 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se diluyó Dbait en 150 μM de NaCl y se mezcló suavemente con un volumen igual de PEI en 150 mM de NaCl y se añadió al medio DMEM sin suero. coDbait se añadió directamente al medio DMEM sin suero. La transfección de moléculas Dbait se realizó con reactivo Superfect en 1,2 ml de medio DMEM con suero (en placas de 60 mm de diámetro) durante 5 horas y después las células se dejaron recuperar durante 1 hora si no se indicó de cualquier otra manera. Para la electroporación, se transfectaron $1,2 \times 10^6$ células con 2 μg de Dbait mediante el uso del Gene Pulser II (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francia). Al final de las 5 h de transfección (tiempo cero), el medio se reemplazó por medio completo y las células se cultivaron el tiempo indicado antes de analizarse. Se añadió cloroquina (50 μM) 30 min antes de la transfección.

Citometría de flujo

Las células se transfectaron con diferentes complejos con Dbait-cy3 durante 5 h y se dejaron crecer 5 horas o 24 horas, y se lavaron rápidamente con PBS. Las células se analizaron directamente mediante citometría de flujo. Para la detección de inmunofluorescencia por citometría de flujo, las células se fijaron en paraformaldehído al 2 % durante 10 min antes de la inmunodetección. Cabe señalar que el tratamiento de permeabilización eliminó la mayor parte de Dbait lo que perjudicó la detección de inmunofluorescencia y la detección de Dbait en las mismas células. Las células se fijaron durante 15 min en formaldehído al 4 %, se permeabilizaron en Triton X-100 al 0,2 % durante 1 hora, se bloquearon con BSA al 2 % y se incubaron con anticuerpo primario durante 2 horas en hielo con anticuerpos monoclonales de ratón anti γ -H2AX (Upstate Biotechnology, Temecula, CA, EE.UU.) y se revelaron con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa-488 (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.), Texas Rojo (Rockland, Gilbertsville, PA, EE.UU.) a una dilución de 1/200 durante 30 min a TA. Las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en PBS con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de yoduro de propidio, 25 U/ml de ARNasaA. Las células se analizaron mediante un citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) y los datos se analizaron mediante el uso de BD CellQuest Pro (BD Biosciences) y el programa informático WinMDI 2.8 (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EE.UU.).

Cría de pez cebra, recolección y tratamiento de embriones

Los huevos de pez cebra se obtuvieron a partir del desove natural de líneas de peces de tipo silvestre o transgénicos (β actina:egfp-ras). Se usaron un micromanipulador Narishige (MN 153) fijados en un escopio de disección con iluminación de epifluorescencia (Leica MZ16F) y un inyector de aire (Eppendorf FemtoJet) para realizar la inyección de Dbait en el estadio celular 1K. Los capilares de vidrio (Aparato Harvard GC100-10) se extrajeron con un extractor de pipetas vertical KopF (KopF 720) para hacer las agujas de inyección. Se inyectaron 2 a 5 nl de solución de Dbait en el polo animal de embriones en el ciclo celular 10 y se procesaron inmediatamente para obtener imágenes de microscopía confocal con barrido de láser (Leica SP2 vertical) con objetivo de lente de inmersión en agua 40x/0,8 NA. La obtención de imágenes se realizó por excitación simultánea a 480 nm (eGFP) y 561 nm (cy3). Los embriones se cultivaron posteriormente a 28,5 °C hasta 24 hpf. Se observaron larvas de un día de edad bajo el tope de disección y fenotipos de clasificaron como se describe en la Figura 3. El tratamiento con cloroquina antes de la inyección consistió en 2 horas de incubación en medio embrionario (The Zebrafish Book) con 50 μM de cloroquina. Se inyectó Dbait

(coDbait)-cy3 50 μ M ya sea solo o en combinación con PEI25K (relación N/P=9), PEI11K (relación N/P=6), Superfect (10 μ l/1 μ g de Dbait).

Dbait y tratamientos de irradiación en ratones

5 Los tumores de xenoinjerto SK28 o U87G se obtuvieron mediante la inyección de 10^6 células tumorales en el flanco de ratones desnudos adultos hembras (cepa Charles River; L'arbresle, Francia). Los animales se alojaron en el laboratorio al menos una semana antes de comenzar los experimentos. Hubo 5-6 animales por jaula en condiciones controladas de ciclos de luz y oscuridad (12 h:12 h), humedad relativa (55 %) y temperatura (21 °C). El agua del grifo y el alimento estuvieron disponibles *ad libitum*. Después de aproximadamente 12 días, cuando los tumores subcutáneos midieron 150-200 mm³, los ratones se separaron en grupos homogéneos de como máximo 12 cada uno para recibir diferentes tratamientos. La irradiación se llevó a cabo en una unidad ¹³⁷Cs (0,5 Gy/min) con un escudo diseñado para proteger aproximadamente dos tercios del cuerpo del animal. Las dosis se controlaron por dosimetría de termoluminiscencia. Se suministró una dosis total de 30 Gy en 6 sesiones a intervalos de tres sesiones de 5 Gy por semana durante dos semanas. Las moléculas Dbait se prepararon en 100 ml de sacarosa al 10 % como se describió anteriormente para estudios *in vitro*, excepto que la mezcla de PEI se realizó sin NaCl (Polyplus Transfection, Strasbourg, Francia). Las mezclas de Dbait se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente antes de la inyección. Se diluyó coDbait en sacarosa al 10 % a la concentración requerida. Las inyecciones intratumorales de la cantidad indicada de Dbait se realizaron 5 h antes de cada sesión de radioterapia. Los animales tratados con simulación se inyectaron con 100 μ l de glucosa al 10 % de acuerdo con el protocolo de los ensayos asociados. El tamaño del tumor se evaluó por mediciones con un calibrador cada tres días y el tamaño se calculó por la fórmula ($2 \times \text{longitud} \times \text{ancho}^2$). Los ratones se pesaron y se tomaron imágenes de los tumores cada semana. Por razones éticas, los animales se sacrificaron cuando sus tumores alcanzaron 2000 mm³. Este criterio de valoración usado en el análisis de supervivencia fue el día de la muerte. El Comité Local de Ética de la Experimentación Animal (Orsay, Francia) aprobó todos los experimentos.

Análisis estadístico

30 Se realizaron análisis descriptivos de la respuesta tumoral para cada tratamiento y para cada tipo de tumor. El día 1 fue el día de la primera sesión de tratamiento. Todos los animales se siguieron durante al menos 150 días. La vida media se estimó de acuerdo con el método de Kaplan-Meier. El retraso del crecimiento tumoral (TGD) se calculó al restar el tiempo de cuadruplicación del volumen tumoral medio del grupo control de los tiempos de cuadruplicación del volumen tumoral de ratones individuales en cada grupo tratado. El TGD medio se calculó para cada grupo tratado mediante el uso de las mediciones individuales. Las curvas de supervivencia general se evaluaron por estimados de Kaplan-Meier y se compararon mediante el uso de la prueba no paramétrica LogRank ya que los datos no siguen una distribución normal. El análisis se realizó mediante el uso del programa informático statEL (ad Science, París, Francia). Un LogRank global se realizó primero para cada grupo con el mismo tipo de tumor. Después, los tratamientos con Dbait se compararon con respecto al control tratado con simulación. El número de animales (n), el riesgo relativo (RR) y el valor de p se informan en la Tabla 2. Todas las pruebas se consideraron significativas al nivel de significación de 0,05.

Propiedades fisicoquímicas de las partículas de Dbait formuladas

45 El tamaño de partícula del vector/Dbait se determinó mediante la dispersión dinámica de la luz (DLS) en Zetasizer nano series, (Malvern instruments, París, Francia) con estas especificaciones: viscosidad media: 1,150 cP, índice de refracción: 1,45, ángulo de dispersión: 90°, temperatura: 25 °C. Los datos son promedios de 3-5 medidas por muestra y cada medición promedia los datos de 10-15 subcorridos. Los datos se analizaron mediante el uso del programa informático de distribución de números multimodal suministrado con el instrumento. Para la medición del potencial zeta, las partículas se diluyeron en sacarosa al 10 %/10 mM de NaCl para obtener una concentración final de Dbait de 0,1 mg/ml y se midieron con las siguientes especificaciones: 3 mediciones, viscosidad media: 1,054 cP, constante dieléctrica media: 79, temperatura: 25 °C.

Polímeros catiónicos	Relación ^a (p/p)	Tamaño ^b (nm)	Zeta ^c (mV)	Pdl	[C]máx (mg/ml)	proveedor
Superfect	-	>1000	-	1	nd	Qiagen
bPEI25K	2,1	175 ± 51	+40	0,11	1,5	Sigma-Aldrich
PEI22K	1,4	133 ± 25	+46	0,17	1,0	Polyplus Transfection
PEI11k	1,4	125 ± 13	+30	< 0,2	0,8	Polyplus Transfection

^a relación de peso a la que se observa la actividad máxima de Dbait

^b Diámetro promedio (+/- SD) según se determinó mediante dispersión dinámica de la luz (ver Materiales y métodos suplementarios).

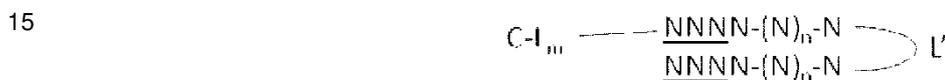
^c Partículas en sacarosa al 1 %, NaCl 10 mM

Microscopía electrónica de transmisión

5 Las muestras se prepararon para microscopía electrónica de transmisión mediante tinción negativa con acetato de uranilo. Se depositó una gota de muestra (10 µl) en la rejilla (formvar/carbono sobre cobre de 200 mesh, Agar Scientific) y se dejó reposar durante 3 minutos antes de eliminar el exceso de líquido con papel secante. Después los complejos se tiñeron con 10 µl de acetato de uranilo acuoso (2 %) durante 2 min y el exceso se retiró con papel secante. Las observaciones se realizaron con un microscopio electrónico Jeol JEM-100S.

10 Moléculas Dbait conjugadas alternativas

Se han preparado moléculas Dbait conjugadas alternativas y se describen a continuación: Moléculas conjugadas de Fórmula (Ile)

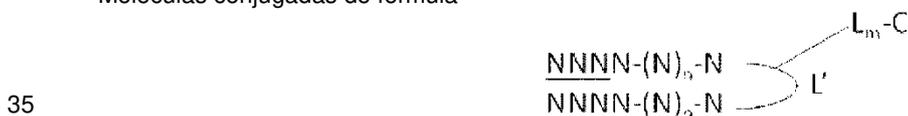


con

20

Compuesto	C-Lm	L'	Masa medida (MALDI-TOF)
0902	Colesterol-trietilenglicol	hexaetilenglicol	20 830,5
25 0903	1,2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[4-(p-fenil-3-((6-fosfohexiltio)succinimido))butiramida]-	hexaetilenglicol	21 306,9
0904	N-octadecil-hexiltioamida-	hexaetilenglicol	20 411,6
30 0905	N-hexil-ácido fólico-amida-	hexaetilenglicol	20 739,2

Moléculas conjugadas de fórmula



con

40

Compuesto	C-Lm	L'	Masa medida (MALDI-TOF)
0813	Colesterol-trietilenglicol	N-(5-hidroximetil-6-fosfohexil)-11-(3-(6-fosfohexiltio)succinimido)) undecamida	21 127,7
45 0815	Colesterol-di-hexilsulfuro	1,3-bis-[5-hidroxilpentilamido]propil-2-(6-fosfohexil)	21 454,0

La actividad de estas moléculas Dbait conjugadas alternativas se ha medido a través de la inhibición de la ADN-PK como se detalló anteriormente (Figura 7). Se ha observado que las moléculas conjugadas mantienen su actividad. En particular, la conjugación de diversos lípidos y ligando en cualquier extremo 5' o en el lazo tiene un impacto menor sobre la capacidad de estas moléculas para desencadenar la actividad de ADN-PK.

50

Además, su actividad también se ha medido en líneas celulares, con o sin cloroquina, a través de la disminución de la cantidad de fosforilación de H2AX como se detalló anteriormente (Figura 8). Primero, para las moléculas Dbait conjugadas analizadas, se ha observado que su actividad es mayor con un tratamiento anterior con cloroquina. Además, puede observarse que la conjugación del colesterol al extremo 5' conduce sorprendentemente a moléculas más eficaces que la conjugación del colesterol en el lazo de la horquilla (ver 0902 en comparación con 0813 y 0815).

Captación celular de moléculas Dbait conjugadas

La absorción celular de la Dbait conjugada al colesterol, en particular CoDbait, en comparación con la Dbait, se midió por los inventores mediante análisis de citometría de flujo.

Los resultados se proporcionan en la siguiente tabla.

Condiciones de transfección	Intensidad de fluorescencia Cy3 @5 h.	
	Mediana	Promedio
Dbait-Cy3 79 nM	3	3
Dbait-Cy3 79 nM + Superfect	426	327
CoDbait-Cy3 79 nM	10	10
CoDbait-Cy3 79 nM + CQ 50µM	20	21
CoDbait-Cy3 986 nM	63	66
CoDbait-Cy3 986 nM + CQ 50µM	239	236
Co_ARNip_H2AX-Cy3 79 nM	53	56
Co_ARNip_H2AX-Cy3 79 nM + CQ 50µM	60	63
Co_ARNip_H2AX 986 nM	661	710
Co_ARNip_H2AX-Cy3 986 nM + CQ 50µM	1144	1214

Co_ARNip_H2AX que son ejemplos de referencia.

Análisis por citometría de flujo de la captación celular en la línea celular MRC5 realizada a las 5 horas después del inicio del tratamiento de diversas condiciones de transfección como se describe en la tabla. Todos los oligonucleótidos se etiquetaron mediante colorante de cianina 3 (Cy3): Dbait (Dbait-Cy3), colesterol-Dbait (0813)(CoDbait-Cy3) y ARNip que se dirige a H2AX con una cianina 3 y un colesterol en los extremos 5' y 3' de la cadena sentido (Co_ARNip_H2AX: Cy3-5'-CAACAAGAAGACGCGAAUCTT-3'-colesterol (SEQ ID NO: 6); 5'-GAUUCGCGUCUUCUUGGTT-3' (SEQ ID NO: 7). Cuando se indicó, se añadió 50 µM de cloroquina (CQ) antes de la transfección.

Listado de secuencias

<110> DNA Therapeutics Institut Curie

<120> Sistema de suministro in vivo optimizado con agentes endosomolíticos para conjugados de ácidos nucleicos

<130> B1050EPPC2

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 32

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Dbait32

<400> 1

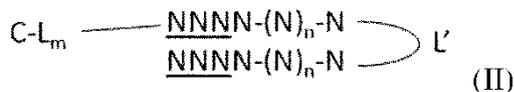
ES 2 784 793 T3

acgcacgggt gttgggtcgt ttgtcggat ct 32
 <210> 2
 <211> 32
 5 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Dbait32Ha
 10
 <400> 2
 cgtaggtctg ttggtggct ttgcagtggc ac 32
 <210> 3
 15 <211> 32
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Dbait32Hb
 <400> 3
 gctaggcttg ttgctgggt tgtaggcaca gc 32
 25 <210> 4
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Dbait32Hc
 <400> 4
 35 gctgtgccca caaccagca aacaagccta ga 32
 <210> 5
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Dbait32Hd
 <400> 5
 45 gctaggtctg ttggtggct ttgcagtggc ac 32
 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> ARNip
 55 <400> 6
 caacaagaag acgcgaauct t 21
 <210> 7
 <211> 21
 60 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> ARNip
 65 <400> 7
 gauucgguuc uucuuguugt t 21

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico conjugada que tiene la siguiente fórmula:

5



10

en donde N es un desoxinucleótido, n es un número entero de 21 a 95, la N subrayada se refiere a un nucleótido que tiene una cadena principal de fosfodiéster modificada, L' es un enlazador; m es 1 y L es un oligoetilenglicol carboxamido, C se selecciona del grupo que consiste en ácido graso octadecil o dioleoil, folatos o ácido fólico y colesterol.

15

2. La molécula de ácido nucleico conjugada de conformidad con la reivindicación 1, en donde n es de 27 a 95.

3. La molécula de ácido nucleico conjugada de conformidad con la reivindicación 1, en donde n es 27.

20

4. La molécula de ácido nucleico conjugada de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde L' se selecciona del grupo que consiste en hexaetilenglicol, tetradesoxtimidilato (T4), 1,19-bis(fosfo)-8-hidraza-2-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano y 2,19-bis(fosfor)-8-hidraza-1-hidroxi-4-oxa-9-oxo-nonadecano.

25

5. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico conjugada de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 5, en donde dicha composición comprende, además, un agente antitumoral que daña el ADN y un portador aceptable farmacéuticamente.

30

7. Un kit que comprende una molécula de ácido nucleico conjugada de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un agente antitumoral que daña el ADN, como una preparación combinada para el uso simultáneo, separado o secuencial.

35

8. Una molécula de ácido nucleico conjugada de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso para tratar un cáncer en un sujeto que lo necesita.

9. La molécula de ácido nucleico conjugada para su uso de conformidad con la reivindicación 8, en combinación con radioterapia o quimioterapia, opcionalmente, con un agente antitumoral que daña el ADN.

Figura 1A

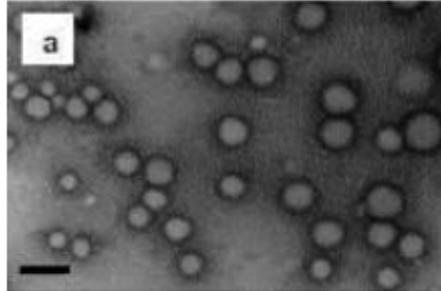


Figura 1B

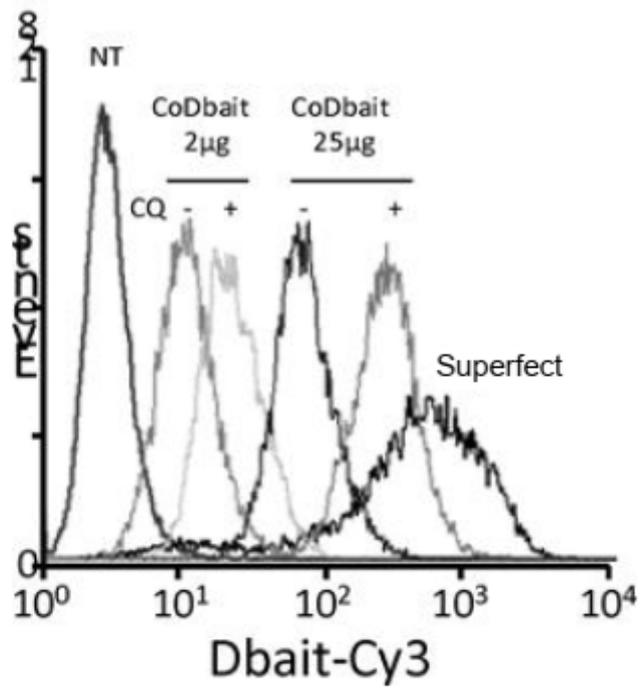


Figura 2A

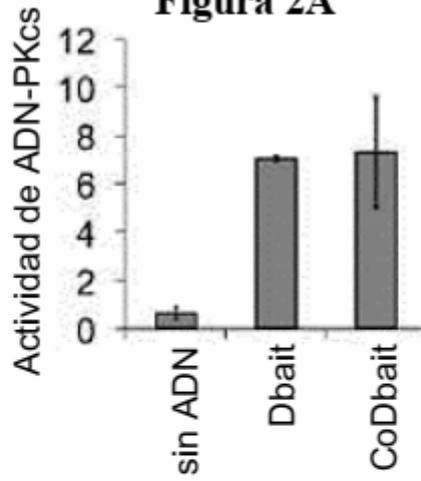


Figura 2B

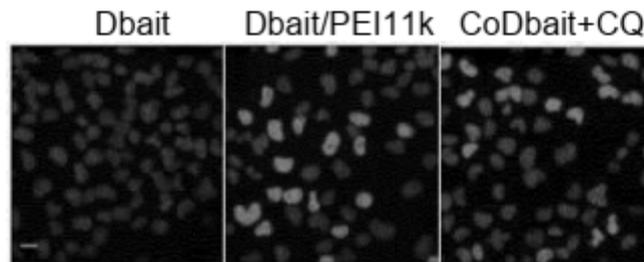


Figura 2C

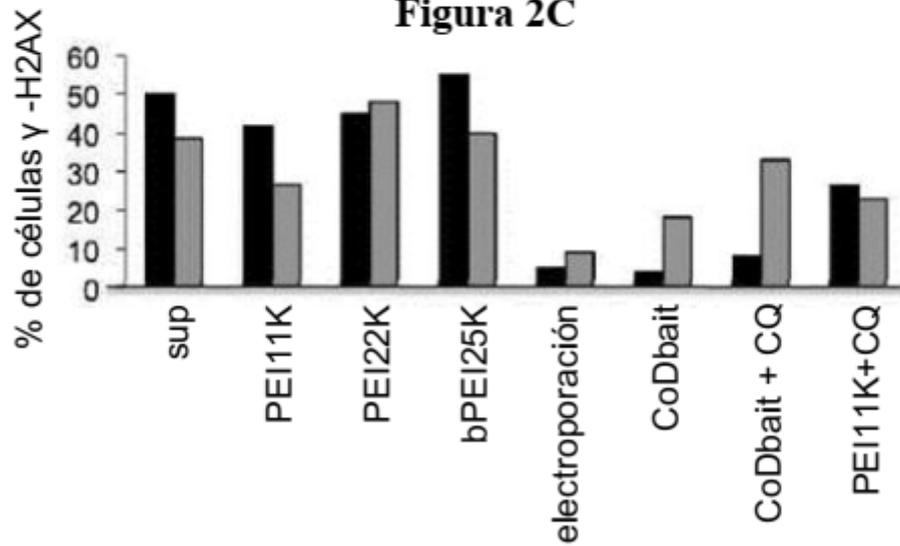


Figura 3A

Figura 3B

Figura 3C

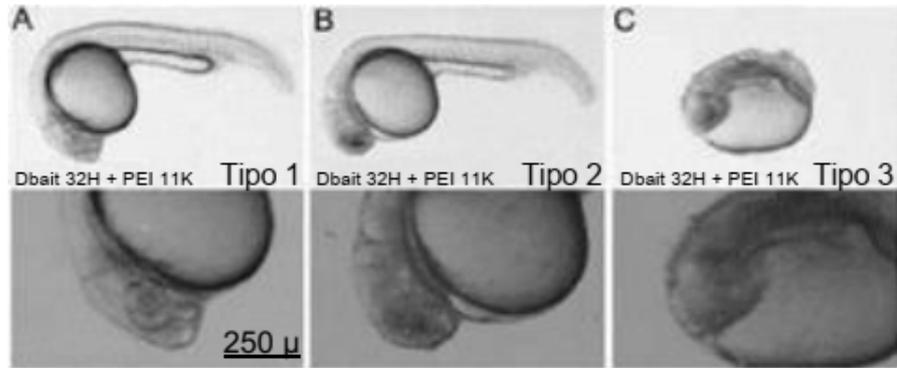


Figura 3D

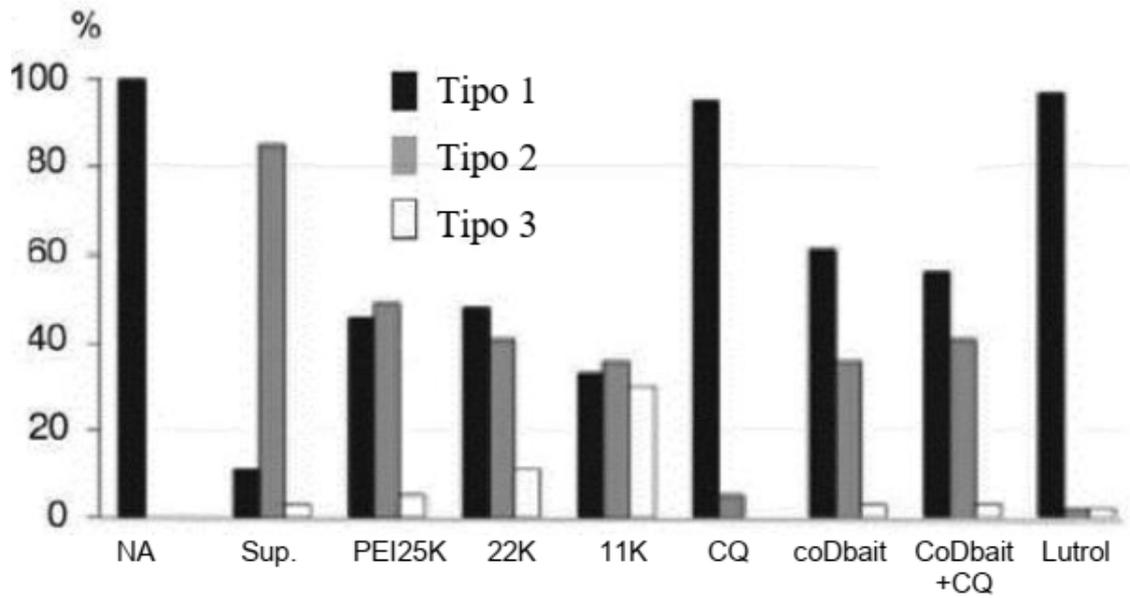


Figura 4

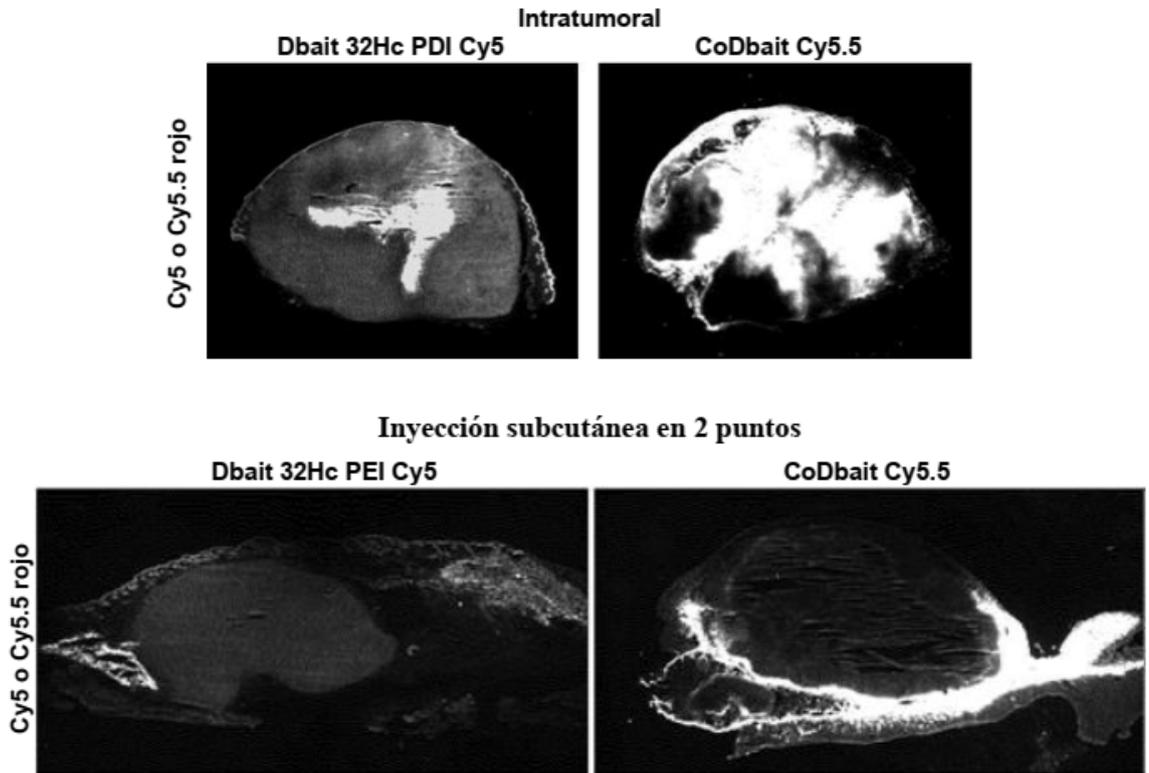


Figura 5

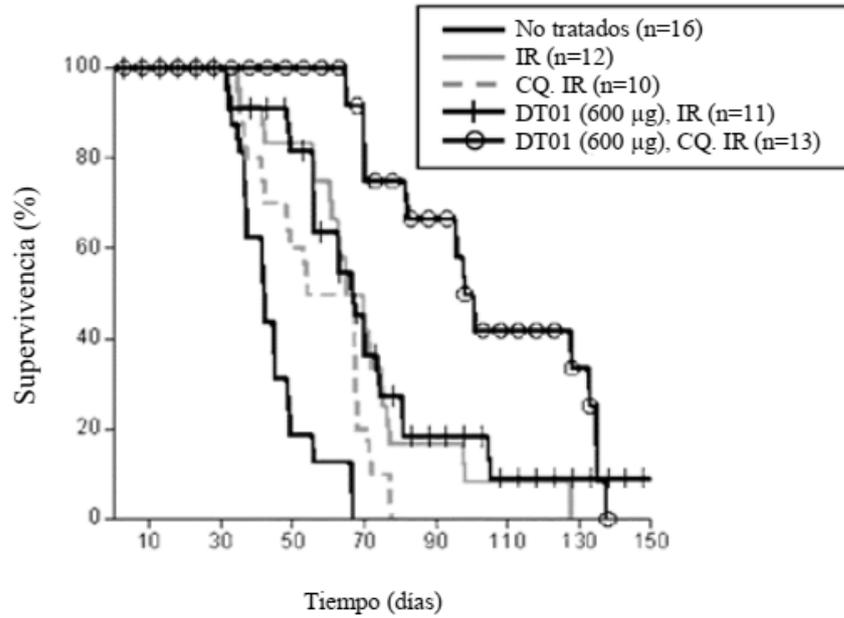


Figura 7

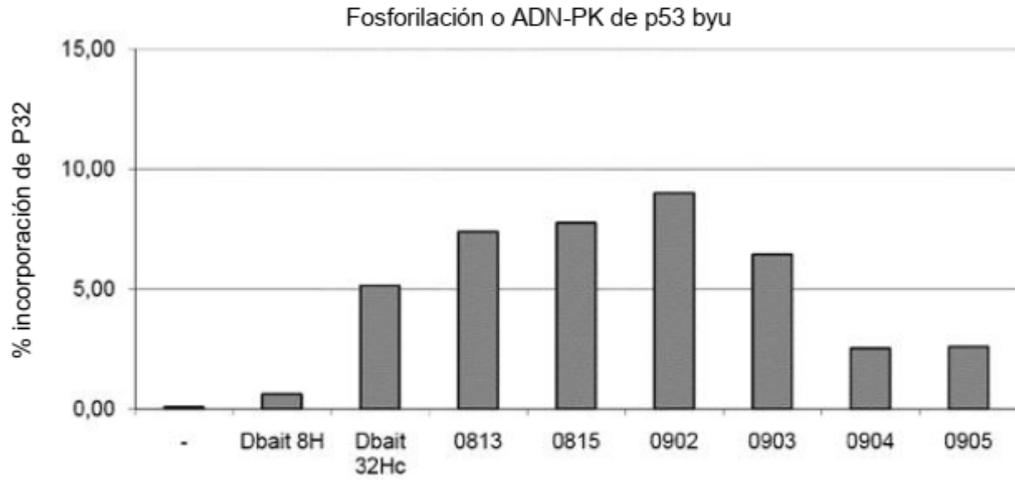


Figura 8

