



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **3 042 223**

⑮ Int. Cl.:

A61K 31/60 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2020 PCT/EP2020/062002**

⑰ Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2020 WO20221849**

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2020 E 20722582 (2)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2025 EP 3962491**

⑭ Título: **Suministro intracelular de anticuerpos anti-KRAS formulados en nanocápsulas**

⑩ Prioridad:

**01.05.2019 EP 19172120
19.03.2020 EP 20382206**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.11.2025

⑬ Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.00%)
Edificio EMPRENDIA Campus Vida Santiago de
Compostela
15782 Santiago de Compostela, ES**

⑭ Inventor/es:

**ALONSO FERNANDEZ, MARÍA JOSÉ y
TEIJEIRO OSORIO, DESIREÉ**

⑭ Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

Observaciones:

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

ES 3 042 223 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

Suministro intracelular de anticuerpos anti-KRAS formulados en nanocápsulas

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al suministro intracelular de anticuerpos contra oncoproteínas KRAS mutadas donde los anticuerpos se formulan dentro de partículas, nanocápsulas u otras nanoentidades para que puedan acceder al interior de las células donde liberan su contenido.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El suministro dirigido de agentes farmacéuticos dentro del cuerpo ha sido un desafío continuo. Por ejemplo, muchos fármacos no pueden ejercer su acción de forma eficaz debido a su difícil acceso a las células diana. Hasta ahora, las terapias contra el cáncer basadas en anticuerpos monoclonales solo podían dirigirse hacia proteínas extracelulares, mientras que cientos de oncoproteínas intracelulares, de extraordinaria relevancia en el cáncer, permanecen inaccesibles a los fármacos.

20 Los genes RAS activados por mutaciones (HRAS, KRAS y NRAS) comprenden la familia de genes mutados con mayor frecuencia en el cáncer. Los tres genes RAS codifican cuatro proteínas de 188–189 aminoácidos que comparten una identidad de secuencia de aminoácidos de 82 %–90 %. KRAS es un gen que actúa como un interruptor de encendido/apagado en la señalización celular. Cuando funciona normalmente, controla la proliferación celular. Cuando está mutado, la señalización negativa se interrumpe y las células pueden proliferar continuamente y, a menudo, se convierten en cáncer. La proteína KRAS es una GTPasa y generalmente está conectada a las membranas celulares debido a la presencia de un grupo isopreno en su extremo C-terminal. En células inactivas normales, RAS está predominantemente unida a GDP e inactiva. Después de los estímulos extracelulares, la activación de los receptores tirosina quinasas (RTK) y otros receptores de la superficie celular, se produce una formación rápida y transitoria de RAS-GTP, que conduce al acoplamiento de proteínas efectoras que después regulan una diversidad de redes de señalización intracelular y, por lo tanto, controlan los procesos mitogénicos.

25 30 Los genes RAS asociados al cáncer se caracterizan por mutaciones que codifican sustituciones de un solo aminoácido principalmente en los residuos glicina-12 (G12), glicina-13 (G13) o glutamina-61 (Q61). Estas mutaciones hacen que RAS se una a GTP y sea constitutivamente activo independiente de los estímulos extracelulares, lo que resulta en una hiperestimulación de las vías de señalización que conducen al crecimiento del cáncer.

35 40 Los genes RAS activados por mutaciones se identificaron por primera vez en células cancerosas humanas en 1982. Más de 30 años después, la secuenciación intensiva del genoma del cáncer ha revelado que, a pesar de la identificación de más de 500 genes de cáncer validados (base de datos COSMIC, catálogo de mutaciones somáticas en cáncer), los tres genes RAS (HRAS, NRAS y KRAS) aun constituyen la familia de oncogenes mutados con mayor frecuencia en los cánceres humanos (Tabla 1), y se han detectado en el 25-30 % de todas las muestras de tumores secuenciadas (Cox y otros, 2014).

45 Tabla 1. Frecuencia de mutaciones de RAS en cánceres humanos (Cox y otros, 2014)

Cáncer	% KRAS	% NRAS	% HRAS	% All RAS
Adenocarcinoma pancreático ductal	97.7	0.0	0.0	97.7
Adenocarcinoma colorrectal	44.7	7.5	0.0	52.2
Mieloma múltiple	22.8	19.9	0.0	42.6
Adenocarcinoma de pulmón	30.9	0.9	0.3	32.2
Melanoma cutáneo de la piel	0.8	27.6	1.0	29.4
Carcinoma endometriode de cuerpo uterino	21.4	3.6	0.4	24.6
Carcinosarcoma de útero	12.3	1.8	0.0	14.0
Carcinoma de tiroides	1.0	8.5	3.5	13.0
Adenocarcinoma de estómago	11.4	0.9	0.0	12.3
Leucemia mieloide aguda	3.1	6.7	1.6	11.4
Carcinoma urotelial de vejiga	3.1	1.4	5.9	10.6
Adenocarcinoma de cuello	8.3	0.0	0.0	8.3
Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello	0.5	0.3	4.7	5.5
Carcinoma gástrico	4.0	1.0	0.0	5.0
Adenocarcinoma de esófago	4.1	0.0	0.7	4.8

Aunque todos se expresan ampliamente en tejidos adultos y en tumores, la mutación de KRAS es mucho más frecuente en el cáncer humano que NRAS o HRAS, con KRAS que comprende el 85 % de todas las mutaciones de RAS en el cáncer, seguido de NRAS (12 %) y, con poca frecuencia, HRAS (3 %). Una explicación de la alta frecuencia de mutaciones de KRAS, en relación con NRAS y HRAS, es que la proteína KRAS tiene propiedades únicas que favorecen la oncogénesis.

Así, por ejemplo, en el adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC, 90 % de todos los cánceres de páncreas) y en el adenocarcinoma de pulmón (LAC, 40 % de todos los cánceres de pulmón) hay una frecuencia cercana al 100 % y al 25-30 % de mutaciones de KRAS, respectivamente. En los carcinomas colorrectales (CCR), KRAS también es la isoforma mutada predominante (45 %) (Liu y otros, 2019; Ferrer y otros, 2018; Cox y otros, 2014).

También existen diferencias del tipo de cáncer en la frecuencia relativa de mutaciones en las posiciones G12, G13 o Q61. En PDAC, LAC y CRC, las mutaciones de KRAS se encuentran predominantemente en G12. También existen diferencias del tipo de cáncer en las sustituciones observadas en un residuo dado. Por ejemplo, en G12, en PDAC y en CRC la sustitución predominante es G12D, seguida de G12V. Por el contrario, en LAC, la sustitución principal es G12C, que es rara en PDAC. Los experimentos genéticos han demostrado la dependencia del adenocarcinoma de páncreas y pulmón de la expresión oncogénica de KRAS (Fisher y otros, 2001; Ying y otros, 2012), destacando su valor como una diana molecular. Por lo tanto, las proteínas KRAS son actores excepcionalmente importantes en el cáncer y representan una diana farmacológica extraordinariamente bien validada.

Décadas de esfuerzos se han dedicado a desarrollar moléculas pequeñas dirigidas al KRAS oncogénico. Sin embargo, la inhibición directa de los mutantes de KRAS ha demostrado ser extremadamente desafiante, principalmente debido a las dificultades para identificar las cavidades tributarias de acción farmacológica para la unión de moléculas pequeñas en la superficie del RAS, y hasta la fecha no se ha aprobado clínicamente ningún agente. Esto se ha atribuido a la "lisura" de la superficie de la proteína, con la excepción de una cavidad de unión a GTP que se aferra a su sustrato con demasiada fuerza para ser desplazado.

Para el tratamiento de cánceres que portan mutaciones de KRAS, se han propuesto varias estrategias, por ejemplo:

- 30 (1) inhibición de la expresión de la proteína RAS mediante la ribozima de cabeza de martillo o el oligonucleótido antisentido;

- (2) prevención de la localización en la membrana de RAS por inhibidores de farnesiltransferasa o inhibidores de acil proteína tioesterasa 1 (APT1);
 (3) bloqueo de los efectores cadena abajo de la vía de la señal RAS (inhibición de Raf o MEK mediante oligonucleótidos antisentido o inhibidores químicos); y
 5 (4) silenciamiento de los transcritos de KRAS mutante mediante ARN de interferencia que distingue la diferencia de un nucleótido entre KRAS de tipo silvestre y mutante.

10 Sin embargo, la mayoría de estas estrategias tenían limitaciones, tales como la no selectividad o la baja eficacia terapéutica. Por lo tanto, se requiere la implementación de una estrategia más eficaz con selectividad para KRAS mutante para tratar los cánceres relacionados con KRAS mutante.

15 Los anticuerpos, con paratopos de gran área de superficie, son excelentes para dirigirse específicamente a proteínas con alta afinidad. Sin embargo, hasta ahora las terapias contra el cáncer basadas en anticuerpos solo se han dirigido principalmente hacia proteínas extracelulares, mientras que cientos de oncoproteínas intracelulares de extraordinaria relevancia en el cáncer permanecen inaccesibles a los fármacos. Se está intentando dirigirse hacia la modificación de los anticuerpos para conferirles la capacidad de atravesar la membrana celular mediante el uso de dos enfoques principales: (i) conjugación química con péptidos que penetran las células (CPP); y (ii) fusión con la parte de internalización de los autoanticuerpos responsables de su capacidad intrínseca para entrar en las células.

20 20 Sin embargo, en la mayoría de los casos, las concentraciones de anticuerpos usadas *in vitro* están en el intervalo micromolar (Shin y otros, 2017; Akishiba y otros, 2017) y en aquellos estudios que informan datos *in vivo*, los regímenes de dosificación no son extrapolables clínicamente (Shin y otros, 2017). En el caso de las estrategias basadas en CPP, las principales limitaciones están relacionadas con factores tales como una mala estabilidad *in vivo*, la falta de especificidad tisular/celular, una liberación no eficiente de las vesículas endocíticas intracelulares y el retraso en la unión a la diana debido a la presencia del CPP. Algunos inconvenientes de las estrategias basadas en CPP podrían evitarse mediante el uso de los enfoques de proteínas de fusión antes mencionados. Sin embargo, la generación de proteínas de fusión es relativamente tediosa y no es adecuada para un cribado rápido (Slastnikova y otros, 2018; Singh y otros, 2019).

30 30 Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos sistemas de suministro intracelular que puedan suministrar dosis de anticuerpos clínicamente relevantes *in vivo* y que funcionen como plataformas versátiles y rentables para el descubrimiento y desarrollo de terapias intracelulares basadas en anticuerpos.

35 35 Hasta donde conocemos, en el caso de los anticuerpos anti-KRAS se han descrito principalmente en relación con usos diagnósticos y como herramientas de investigación para el estudio de los polipéptidos RAS. Sin embargo, Shin y otros, 2017 informaron del desarrollo de un anticuerpo de formato IgG1 humano, RT11, que se internaliza en el citoplasma de las células vivas y se une selectivamente a la forma activada unida a GTP de varios mutantes Ras oncocéntricos para bloquear las interacciones con proteínas efectoras, de esta manera suprime la señalización corriente abajo y ejerce efectos antiproliferativos en una variedad de células tumorales que portan mutantes Ras oncocéntricos. El anticuerpo RT11 se generó mediante la integración del dominio VH de unión específico de Ras GTP con un fragmento VL que penetra en el citoplasma para formar un único anticuerpo en formato IgG. Por lo tanto, este mecanismo es diferente de la encapsulación de anticuerpos anti-KRAS descrita en la presente descripción.

40 45 Aunque varias empresas y artículos científicos afirman la importancia de desarrollar anticuerpos monoclonales para atacar proteínas intracelulares, hasta donde conocemos no hay una sola descripción de datos *in vivo* que muestren la eficacia de un enfoque basado en nanotecnología para el suministro intracelular de anticuerpos terapéuticos después de la administración IV sistémica. Por lo tanto, se necesitan mejoras en el suministro de agentes farmacéuticos.

50 SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Un problema a resolver por la presente invención es el suministro intracelular de anticuerpos anti-KRAS en concentraciones clínicamente relevantes de manera que conduzcan a un efecto terapéutico.

55 55 La solución se basa en el hallazgo de los presentes inventores de que los anticuerpos anti-KRAS formulados en nanoentidades particulares pueden suministrarse intracelularmente y, además, pueden realizar su actividad biológica dentro de la célula.

60 60 Como se analiza en los Ejemplos de trabajo de la presente descripción, los inventores han asociado con éxito anticuerpos monoclonales anti-KRAS a diferentes composiciones de nanocápsulas poliméricas. Como se muestra en el Ejemplo 5, tales nanocápsulas son capaces de penetrar las membranas celulares y suministrar el anticuerpo al interior de la membrana celular. Las nanocápsulas que contienen AcM anti-KRAS G12V internalizados de manera eficiente en células de adenocarcinoma de colon y el anticuerpo internalizado mostraron una localización

preferencial en el sitio diana, es decir, en el lado interno de la membrana plasmática, donde se localiza el KRAS oncogénico. De manera similar, en el Ejemplo 6, las nanocápsulas poliméricas cargadas con el AcM anti-KRAS G12V se internalizaron eficazmente en células de adenocarcinoma de pulmón. Además, en el Ejemplo 5 se demuestra que tales nanocápsulas pueden inhibir el crecimiento in vitro de células tumorales mutantes de KRAS G12V en porcentajes del 25 % al 50 %. Por lo tanto, se demostró que los anticuerpos anti-KRAS formulados en nanocápsulas pueden suministrarse intracelularmente y, además, pueden realizar su actividad biológica dentro de la célula.

5 Sorprendentemente, el Ejemplo 7 proporciona la primera evidencia in vivo de la eficacia de las nanocápsulas que contienen AcM anti-KRAS G12V en la reducción significativa del crecimiento tumoral en dos modelos de ratones: 10 modelos de tumor de xenoinjerto pancreático y ortotópico de colon sin mostrar signos de toxicidad del tratamiento.

15 Como se discutió, los anticuerpos anti-KRAS como tales no pueden atravesar las membranas celulares y no pueden interactuar con los polipéptidos KRAS, y de este modo bloquear la función de las proteínas diana intracelulares correspondientes y provocar una respuesta terapéutica. Los inventores han demostrado que la encapsulación de 20 anticuerpos anti-KRAS en nanocápsulas poliméricas es un enfoque eficaz para suministrar estos anticuerpos directamente en el citoplasma de las células vivas, lo que produce una respuesta en estudios tanto in vitro como in vivo.

25 Como se dijo antes, a pesar de muchos intentos de desarrollar anticuerpos monoclonales para atacar proteínas intracelulares, hasta donde conocemos, no existe una sola descripción de datos in vivo que muestren la eficacia de 30 un sistema de suministro basado en nanotecnología para la localización intracelular después de la administración IV. Por lo tanto, se cree que la presente invención proporciona el primer enfoque para el suministro intracelular de 35 anticuerpos anti-KRAS encapsulados con resultados satisfactorios in vivo. Por lo tanto, la invención resuelve un problema técnico que los expertos en la técnica han estado intentando resolver durante mucho tiempo, y también satisface una necesidad sentida desde hace mucho tiempo.

Como se analiza en la presente descripción, el hecho de que las presentes nanocápsulas sean capaces de penetrar 30 las membranas celulares y suministrar el anticuerpo en dosis clínicas relevantes al interior de la membrana celular y escapar del compartimento lisosómico es una ventaja significativa en general.

Por ejemplo, en relación con una realización particular de la presente descripción donde las nanocápsulas también comprenden un péptido que penetra en las células y/o un péptido que penetra en el tumor/tejido, puede incluso 35 obtenerse una dosis más alta y una mejor localización del anticuerpo en el tejido tumoral y en las células cancerosas.

La invención se expone en el juego de reivindicaciones adjunto.

En consecuencia, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una composición, que comprende una 40 pluralidad de nanoentidades que comprenden un núcleo interno rodeado por una capa externa, la capa externa comprende un polímero, el núcleo interno comprende al menos un compuesto hidrófobo, donde las nanoentidades comprenden un agente farmacéutico, donde el agente farmacéutico es un anticuerpo o un fragmento de este, donde las nanoentidades pueden suministrar intracelularmente el anticuerpo o el fragmento de este, y donde el anticuerpo o el fragmento de este se une a un epítopo de una proteína KRAS mutada activada.

45 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método para preparar una composición de acuerdo con el primer aspecto, que comprende las etapas de:

50 a) preparar una fase acuosa que comprende un polímero;
 b) preparar una fase hidrófoba que comprende un compuesto hidrófobo;
 c) añadir un anticuerpo o un fragmento de este que se une a un epítopo intracelular de una proteína KRAS mutada activada a la fase acuosa u, opcionalmente, a la fase hidrófoba si el anticuerpo o el fragmento está muy concentrado; y
 d) mezclar la fase acuosa y la fase hidrófoba.

55 Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una composición para usar como un medicamento.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a una composición para usar en el tratamiento o prevención de 60 una enfermedad asociada con una mutación en un gen KRAS.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Esta figura ilustra la estabilidad de nanocápsulas (NC) de HA cargadas con AcM anti-KRAS G12V (NC de HA 290 kDa; AcM 0.5 mg/ml) en plasma humano medido por dispersión dinámica de la luz (DLS).

5 Figura 2: Esta figura ilustra la estabilidad de nanocápsulas (NC) de HA cargadas con AcM anti-KRAS G12V (NC de HA 290 kDa; AcM 0.5 mg/ml) en plasma humano medido por análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).

10 Figura 3: Esta figura ilustra la internalización celular del AcM anti-KRAS G12V (marcado con Alexa Fluor® 488) provocada por nanocápsulas (NC) de HA en células de adenocarcinoma colorrectal SW480 que expresan la mutación KRAS G12V, mediante imágenes de citometría de flujo. La internalización efectiva se determinó mediante el marcaje de los organelos ácidos del citoplasma de las células vivas con un marcador fluorescente Lysotracker®.

15 Figuras 4A-4B: estas figuras muestran la 4A la inhibición de la proliferación celular y la 4B la reducción de la fosforilación de ERK que se produce después de la incubación de células de adenocarcinoma de cáncer de pulmón H441 que expresan la mutación KRAS G12V con nanocápsulas (NC) de C16-HA (NC en blanco y cargadas con anti-KRAS G12V a 166 nM del AcM, 0.4 ng de AcM/dosis celular). [C (-): células no tratadas; BL: NC de C16-HA en blanco; aG12V NC: NC C16-HA cargadas con AcM anti-KRAS G12V].

20 Figura 5: Esta figura muestra la reducción en el crecimiento tumoral en ratones tratados con nanocápsulas (NC) de PSA-tLyp-1 cargadas con AcM anti-KRAS G12V durante el período de tratamiento en comparación con el grupo de control. [C (-): solución salina; aG12V NC: NC de tLyp1-PSA cargadas con anti-KRAS; administración IP; Modelo de tumor de xenoinjerto pancreático subcutáneo de células PA-TU-8902 que expresan la mutación KRAS G12V].

25 Figura 6: Esta figura muestra la reducción en el peso final del tumor de los ratones tratados con NC de HA cargadas con AcM anti-KRAS G12V durante 3 semanas en comparación con el grupo de control. [C (-): PBS; aG12V NC: NC de HA cargadas con anti-KRAS; Administración intravenosa; Modelo de tumor ortotópico colorrectal de fragmentos tumorales subcutáneos derivados de la línea celular SW480 que porta la mutación KRAS G12V].

30 Figura 7: Esta figura ilustra los cambios notables de regresión histológica en tumores de los ratones tratados con NC de HA cargadas con AcM anti-KRAS G12V durante 3 semanas en comparación con el grupo de control. Los portaobjetos de tumores se escanearon y se analizaron con el programa informático NDP-View2 (Hamamatsu), y se calculó el porcentaje de necrosis para cada portaobjetos. [C (-): PBS; aG12V NC: NC de HA cargadas con anti-KRAS; Administración intravenosa; Modelo de tumor ortotópico colorrectal de fragmentos tumorales subcutáneos derivados de la línea celular SW480 que porta la mutación KRAS G12V].

35 Figura 8: Esta figura muestra los cambios de peso corporal de los ratones tratados con NC de HA cargadas con AcM anti-KRAS G12V en comparación con el grupo de control durante el período de tratamiento de 3 semanas [C (-): PBS; aG12V NC: NC de HA cargadas con anti-KRAS; Modelo de tumor ortotópico colorrectal de fragmentos tumorales subcutáneos derivados de la línea celular SW480 que porta la mutación KRAS G12V].

40

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

45 La presente invención se refiere a una composición que comprende partículas, que incluye nanocápsulas u otras nanoentidades que comprenden un núcleo interno rodeado por una capa externa, donde el núcleo interno comprende un compuesto hidrófobo tal como un aceite y la capa externa comprende un polímero tal como el ácido polisiálico (PSA), ácido hialurónico, ácido poliglutámico, ácido poliáspártico, ácido polimálico o ácido poliláctico. Las nanoentidades comprenden, además, un compuesto farmacéutico que es un anticuerpo o un fragmento de este contra una diana localizada intracelular donde el anticuerpo o el fragmento de este se une a un epítopo de una proteína KRAS mutada activada. Las partículas de la presente invención pueden acceder al interior de las células donde liberan el anticuerpo. Además, el recubrimiento polimérico del núcleo oleoso puede conferir una mayor estabilidad y protección contra la agregación, un cambio en el perfil de liberación del fármaco del anticuerpo asociado, una internalización celular aumentada y una interacción específica con determinados tipos de células.

50 El término "núcleo interno" puede denominarse en la presente descripción alternativamente "porción interna" y estos términos pueden usarse indistintamente en la presente descripción.

Anticuerpos contra polipéptidos KRAS mutados

55 Algunos de los primeros anticuerpos capaces de unirse a polipéptidos KRAS mutados se describen en el documento US5084380, que describe anticuerpos monoclonales que reaccionan con polipéptidos KRAS activados que contienen mutaciones de aminoácidos en la posición 12 del polipéptido KRAS y que no reaccionan con proteínas que contienen el aminoácido glicina normal en la posición 12. El inventor del documento US5084380 identificó los anticuerpos E184 y E170 que reaccionaban con polipéptidos KRAS que contenían ácido glutámico en la posición 12

en lugar de glicina (G12E), R256 que reaccionaba con un polipéptido KRAS que contenía arginina en la posición 12 en lugar de glicina (G12R) y DWP que reaccionaba con un polipéptido KRAS que contiene valina en la posición 12 en lugar de glicina (G12V).

- 5 Los anticuerpos monoclonales E170 y E184 se generaron contra un péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 5-16 de un gen ras mutado que codifica ácido glutámico en lugar de glicina en la posición 12. Estos anticuerpos muestran especificidad por los dodecapéptidos que contienen ácido glutámico en la posición 12 pero no por los dodecapéptidos que contienen Gly, Asp, Ser, Arg, Cys, Ala o Val en la posición 12.
- 10 El anticuerpo monoclonal R256 se generó contra un péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 5-16 de un gen ras mutado que codifica arginina en lugar de glicina en la posición 12. El anticuerpo monoclonal R256 reaccionó específicamente con dodecapéptidos que contenían Arg en la posición 12 pero no reaccionó con dodecapéptidos que contenían Gly, Glu, Asp, Ser, Cys, Val o Ala en la posición 12.
- 15 Se generó DWP contra un péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 5-16 de un gen ras mutado que codifica valina en lugar de glicina en la posición 12. DWP reaccionó en ensayos de competencia con péptidos que contenían Val o Cys en la posición 12 pero no con péptidos que contenían Gly, Arg, Ser, Ala, Asp o Glu en la posición 12 (Carney y otros, 1986 y EP0190033).
- 20 Las líneas celulares de hibridoma que secretaban los anticuerpos monoclonales se depositaron en la Colección Americana de Tipos de Cultivos de Tejidos (ATCC) bajo el Tratado de Budapest y se les asignó a E184 el número de acceso HB9194, a E170 el número de acceso HB9195, a R256 el número de acceso HB9196 y a DWP el número de acceso HB8698.
- 25 En realizaciones particulares de la presente invención, el anticuerpo es uno de los anticuerpos descritos anteriormente, descrito en el documento US5084380 o un fragmento de este.
- Se describe además en el documento US5443956, que los anticuerpos monoclonales reactivos con proteínas ras p21 mutadas que tienen ácido aspártico en la posición 12 (G12D) se produjeron por las líneas celulares de hibridoma D113, D205 y D210. Estas líneas celulares se depositaron en la ATCC bajo el Tratado de Budapest. A la línea celular de hibridoma D113 se le otorgó el número de designación ATCC HB10086. A la línea celular de hibridoma D205 se le otorgó el número de designación ATCC HB10061. A la línea de células de hibridoma D210 se le otorgó el número de designación ATCC HB10083.
- 30
- 35 En realizaciones particulares de la presente invención, el anticuerpo es uno de los anticuerpos descritos anteriormente, descrito en el documento US5443956 o un fragmento de este.
- Otros anticuerpos monoclonales que se unen a polipéptidos KRAS mutados se han desarrollado, por ejemplo, por Abcam e incluyen ab221163, ab264094 y ab264095; por NewEast Bioscience e incluyen los números de catálogo: 40 26036 (G12D), 26038 (G12D), 26193 (Q61L), 26474 (G13R), 26192 (Q61R), 26477 (G13V), 26195 (Q61H), 26191 (G13A) y 26186 (G12S); por Cell Signaling e incluyen Ras (específico del mutante G12D) (D8H7) AcM núm. 14429 de conejo y Ras (específico del mutante G12V) (D2H12) AcM núm. 14412 de conejo; y por Sigma-Aldrich e incluyen G12V Ref. OP38 AcM de ratón Anti-Pan-Ras (Ab-1).
- 45 En una modalidad, el epítopo de la proteína KRAS mutada activada comprende una mutación del residuo de glicina en la posición 12, el residuo de glicina en la posición 13 o el residuo de glutamina en la posición 61 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 que corresponde a la secuencia polipeptídica de la Isoforma 2B humana de GTPasa KRas (la isoforma principal expresada en tumores humanos) que tiene la referencia de UNIPROT P01116-2 (RASK_HUMAN).
- 50 En otra modalidad, la mutación en la posición 12 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 se selecciona del grupo que consiste en arginina, G12R, ácido aspártico, G12D, valina G12V y cisteína G12C. En una realización adicional, la mutación en la posición 13 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 se selecciona del grupo que consiste en arginina, G13R, ácido aspártico, G13D y valina G13V. Aun en una realización adicional, la mutación en la posición 61 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 se selecciona del grupo que consiste en glutamina Q61R, leucina Q61L e histidina Q61H.
- 55
- 60 El experto en la técnica conoce cómo seleccionar anticuerpos que se unen a tales epítopos descritos, sin embargo, en una modalidad, el anticuerpo o el fragmento de este se une a un epítopo de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en KLVVVGAVGVGK SEQ ID NO: 40, KLVVVGADGVGK SEQ ID NO: 41 y KLVVVGACGVGK SEQ ID NO: 42.

En una realización adicional, el anticuerpo o el fragmento de este se une al mismo epítopo de la proteína KRAS mutada activada humana que el anticuerpo que se obtiene de una línea celular de hibridoma con un número de depósito seleccionado del grupo que consiste en ATCC-HB-10086 D113, ATCC-HB-10083 D210 y ATCC-HB-8698 DWP.

5 Aun en una realización adicional, el anticuerpo o el fragmento de este se obtiene a partir de una línea celular de hibridoma con número de depósito seleccionado del grupo que consiste en ATCC-HB-10086 D113, ATCC-HB-10083 D210 y ATCC-HB-8698 DWP.

10 Los hibridomas mencionados anteriormente se obtuvieron de la ATCC, se revitalizaron y se obtuvieron los anticuerpos correspondientes.

15 En una realización adicional, el anticuerpo o el fragmento de este se une al mismo epítopo de la proteína KRAS mutada activada humana que el anticuerpo que se obtiene de una línea celular de hibridoma con un número de depósito seleccionado del grupo que consiste en DSM ACC3358, ATCC-HB-10083 D210, ATCC-HB-8698 DWP, ATCC-HB-10086-D113 y DSM ACC3359.

20 Aun en una realización adicional, el anticuerpo o el fragmento de este puede obtenerse de una línea celular de hibridoma con número de depósito seleccionado del grupo que consiste en DSM ACC3358, ATCC-HB-10083 D210, ATCC-HB-8698 DWP, ATCC-HB-10086-D113 y DSM ACC3359.

25 Las líneas celulares de hibridoma DSM ACC3358 y DSM ACC3359 se depositaron en la Colección del Instituto de Leibniz DSMZ-Alemania de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH (Inhoffenstraße 7B. 38124 Braunschweig. ALEMANIA) en la fecha de deposición del 16 de octubre de 2019. Las células depositadas son viables y mantienen todas sus características relacionadas con su depósito. La línea celular de hibridoma de ratón G12D D113-2-1 se depositó con el número de acceso DSM ACC3358 y la línea celular de hibridoma de ratón G12V DWP-1-1-3 con el número de acceso DSM ACC3359. El depositante es la Universidad de Santiago de Compostela, España.

30 Se obtuvo la secuencia de ADN del anticuerpo anti-KRAS de la línea celular de hibridoma depositada como DSM ACC3359. El anticuerpo correspondiente es un anticuerpo monoclonal anti-KRAS G12V. En una modalidad, el anticuerpo o el fragmento de este comprende una región variable de cadena pesada CDR1: (SEQ ID NO: 33) SGYYWN, una región variable de cadena pesada CDR2: (SEQ ID NO: 34) YIGYDGTNNYNPSLKN, una región variable de cadena pesada CDR3: (SEQ ID NO: 35) LWDY, una región variable de cadena ligera CDR1: (SEQ ID NO: 36) RSSQQTIVHGNQNTYLE, una región variable de cadena ligera CDR2: (SEQ ID NO: 37) TVSNRFS y una 35 región variable de cadena ligera CDR3: (SEQ ID NO: 38) FQGSHAPYT.

En una realización particular, el anticuerpo o el fragmento de este comprende una región de cadena pesada con la SEQ ID NO: 43 y una región de cadena ligera con la SEQ ID NO: 44.

40 Se obtuvo la secuencia de ADN del anticuerpo anti-KRAS de la línea celular de hibridoma depositada como DSM ACC3358. El anticuerpo correspondiente es un anticuerpo monoclonal anti-KRAS G12D. En una modalidad, el anticuerpo o el fragmento de este comprende una región variable de cadena pesada CDR1: (SEQ ID NO: 45) SYYYMY, una región variable de cadena pesada CDR2: (SEQ ID NO: 46) EINPSNGGTFNFNEKFKS, una región variable de cadena pesada CDR3: (SEQ ID NO: 47) GGYGY, una región variable de cadena ligera CDR1: (SEQ ID NO: 29) RSSKSLLYKDGKTYLN, una región variable de cadena ligera CDR2: (SEQ ID NO: 30) LMSTRAS y una 45 región variable de cadena ligera CDR3: (SEQ ID NO: 31) QQVVEYPRT.

En una realización particular, el anticuerpo o el fragmento de este comprende una región de cadena pesada con la SEQ ID NO: 10 y una región de cadena ligera con la SEQ ID NO: 17.

50 En una realización particular, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Más particularmente, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humanizado o un derivado químérico para administración humana.

Anticuerpo o fragmento de este

55 El término "anticuerpo" como se usa en la presente descripción se refiere a (a) polipéptidos de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de polipéptidos de inmunoglobulina, es decir, polipéptidos de la familia de inmunoglobulinas, o fragmentos de estos, que contienen un sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno específico, o (b) derivados sustituidos conservadoramente de tales polipéptidos o fragmentos de inmunoglobulina que se unen inmunoespecíficamente al antígeno. Por lo tanto, tanto el anticuerpo como el fragmento de este son los que tienen un sitio de unión al antígeno, es decir, pueden unirse a epítopos de KRAS mutados.

El término anticuerpo también incluye un "derivado de anticuerpo", que significa un anticuerpo, como se define anteriormente, que se modifica mediante la unión covalente de una molécula heteróloga tal como, por ejemplo, mediante la unión de un polipéptido heterólogo, o mediante glicosilación, acetilación o fosforilación no asociadas normalmente con el anticuerpo y similares.

- 5 En una realización particular, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que se refiere a un anticuerpo que se deriva de un clon de una única célula, que incluye cualquier clon de células eucariotas o procariotas, o un clon de fagos, y no el método por el que se produce. Por lo tanto, el término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente descripción no se limita a anticuerpos producidos mediante la tecnología de hibridomas.
- 10 La unidad básica de la estructura de un anticuerpo es un complejo de cuatro polipéptidos: dos cadenas idénticas de bajo peso molecular ("ligeras") y dos cadenas idénticas de alto peso molecular ("pesadas"), unidas entre sí mediante asociaciones no covalentes y por enlaces disulfuro. Los diferentes anticuerpos tendrán entre una y cinco de estas unidades básicas. El anticuerpo puede representarse esquemáticamente como una "Y". Cada rama de la "Y" está formada por la porción amino terminal de una cadena pesada y una cadena ligera asociada. La base de la "Y" está formada por las porciones carboxi terminales de las dos cadenas pesadas. El nodo de la "Y" se denomina región de bisagra.
- 15 Se reconocen cinco clases de anticuerpos humanos (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE) y, dentro de estas clases, varias subclases (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o se reconocen subclases de moléculas de inmunoglobulinas sobre la base de diferencias estructurales, tales como el número de unidades de inmunoglobulina en una única molécula de anticuerpo, la estructura de puente disulfuro de las unidades individuales y las diferencias en la longitud y secuencia de la cadena. La clase y subclase de un anticuerpo es su isotipo.
- 20 El anticuerpo puede ser un anticuerpo intacto o un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno tal como, por ejemplo, un Fab, un F(ab'), un F(ab')2, una cadena Fd, un Fv monocatenario (scFv), un anticuerpo monocatenario, un Fv unido por disulfuro (sdFv), un fragmento que comprende un dominio VL o VH, o fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab. Los fragmentos de anticuerpos que se unen al antígeno, que incluyen los anticuerpos monocatenarios, pueden comprender las regiones variables solas o en combinación con la totalidad o una parte de las siguientes: región bisagra, dominios CH1, CH2, CH3, CH4 y CL. Además, los fragmentos de unión al antígeno pueden comprender cualquier combinación de regiones variable con una región bisagra, dominios CH1, CH2, CH3, CH4 y CL. En algunas modalidades, un fragmento de anticuerpo comprende al menos un dominio, o parte de un dominio, que incluye enlaces disulfuro entre cadenas.
- 25 Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como una serie de fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Por lo tanto, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo (es decir, hacia el dominio Fc) de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir F(ab')2, un dímero de Fab que a su vez es una cadena ligera unida a VH-CH1 por un enlace disulfuro. El F(ab')2 se reduce en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, de esta manera se convierte el dímero (Fab')2 en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra. Aunque varios fragmentos de anticuerpo se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, estos y otros fragmentos también se sintetizan de novo, por ejemplo, químicamente mediante el uso de la metodología de ADN recombinante, mediante métodos de "presentación de fagos" o similares. Los ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos monocatenarios, por ejemplo, anticuerpos Fv monocatenarios (scFv) en los que se unen una cadena pesada variable y una cadena ligera variable (directamente o mediante un enlazador peptídico) para formar un polipéptido continuo. Ejemplos adicionales no limitantes de anticuerpos incluyen nanocuerpos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos químicos, anticuerpos químicos inversos, etcétera. Los fragmentos de unión al antígeno incluyen Fab, Fab', F(ab)2, dsFv, sFv, unicuerpos, minicuerpos, diacuerpos, tricuerpos, tetracuerpos, nanocuerpos, procuerpos, cuerpos de dominio, unicuerpos, fragmento variable monocatenario biespecífico (bi-scFv) y similares.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión y reconocimiento al antígeno completo. Esta región consiste en de un dímero de una cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. En conjunto, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.
- Las afinidades de los anticuerpos pueden determinarse como se describe en los ejemplos de la presente descripción más abajo. Los anticuerpos particulares son aquellos que se unen al péptido KLVVVGAVGVGK (SEQ ID NO: 40) o KLVVVGADGVGK (SEQ ID NO: 41) con un valor de Kd de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M; particularmente

no más de aproximadamente 1×10^{-8} M; particularmente dentro del intervalo entre 1 y 10 nM, más particularmente entre 3 y 5 nM, más particularmente con un valor de Kd de 3.9 nM y 5 nm.

5 Típicamente, los anticuerpos son humanos, de roedores (por ejemplo, ratón y rata), de burro, de oveja, de conejo, de cabra, de cobaya, de camélido, de caballo o de pollo. Como se usa en la presente descripción, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de colecciones de inmunoglobulinas humanas, de células B humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas. Los anticuerpos pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad.

10 Partículas/nanocápsulas/nanoentidades

15 Una "nanoentidad", como se usa en la presente descripción, es típicamente una nanoentidad que tiene un diámetro promedio de menos de 1000 nm, por ejemplo, menos de 750 nm, menos de 500 nm, menos de 300 nm, menos de 250 nm, menos de 200 nm, menos de 150 nm o menos de 100 nm. En algunos casos, las nanoentidades tienen un diámetro medio de al menos 1 nm, 5 nm, 10 nm, 50 nm, 100 nm, 500 nm o 1000 nm. Además, son posibles combinaciones de cualquiera de estos diámetros, por ejemplo, la nanoentidad tiene un intervalo promedio de diámetros de entre 100 nm y 300 nm, entre 1000 nm y 1 nm, entre 1000 nm y 10 nm, entre 750 nm y 1 nm, entre 500 nm y 10 nm, entre 300 nm y 10 nm, entre 250 nm y 10 nm, entre 200 nm y 10 nm, entre 150 nm y 10 nm, entre 100 nm y 10 nm, o similares. En algunas realizaciones también están presentes más de una nanoentidad y, en tales casos, el diámetro medio (aritmético) de la pluralidad de nanoentidades tiene las dimensiones descritas aquí. En algunos casos, están presentes nanoentidades que tienen un intervalo de diámetros. Tales nanoentidades se determinan mediante una variedad de métodos, tales como técnicas de dispersión de luz láser o dinámicas. Los ejemplos de nanoentidades incluyen nanopartículas, nanocápsulas, micelas u otras nanoentidades tales como las descritas en la presente descripción.

20 En algunos casos, la nanoentidad incluye un núcleo interno rodeado por una capa externa, por ejemplo, expuesto al entorno que rodea a la nanoentidad. El núcleo interno está posicionado simétrica o asimétricamente dentro de la nanoentidad. El núcleo interno contiene, por ejemplo, un líquido (que es, por ejemplo, no acuoso o acuoso), un sólido y/o combinaciones de estos. En algunas modalidades, el núcleo interno contiene uno o más fármacos o agentes farmacéuticos. Por ejemplo, el núcleo interno contiene un anticuerpo monoclonal y una molécula pequeña tal como docetaxel.

25 En algunos casos, la nanoentidad es una cápsula (por ejemplo, una nanocápsula). La cápsula es sustancialmente sólida o tiene una cubierta de goma o similar a un gel. Además, en algunos casos, la nanoentidad es una partícula, tal como una nanopartícula. La partícula es sólida y tiene una forma bien definida. En algunos casos, la partícula es una nanoentidad que tiene un núcleo interior rodeado por una capa externa, por ejemplo, la partícula es una cápsula. La nanocápsula tiene un tamaño en el intervalo nanométrico. Si la nanopartícula es generalmente esférica, también puede denominarse nanoesfera. Una nanocápsula es sustancialmente uniforme, aunque tiene características superficiales adicionales, tales como porciones de direccionamiento, potenciadores de la penetración, anticuerpos o similares, que incluye los descritos en la presente descripción.

30 En algunos casos, la partícula es una nanoentidad que tiene un núcleo interno rodeado por una capa externa, por ejemplo, la partícula es una cápsula o una nanocápsula. En algunos casos, una nanocápsula tiene un tamaño en el intervalo nanométrico que comprende un núcleo interno y una capa externa que tiene una composición distingible del núcleo interno. El núcleo interno puede ser, por ejemplo, un material líquido o sólido. A menudo, pero no siempre, el núcleo interno es un aceite. La capa externa está formada por un material continuo y típicamente no está unida covalentemente al núcleo interno. En algunos casos, la capa externa tiene un espesor medio de al menos 1 nm, al menos 2 nm, al menos 3 nm, al menos 5 nm, al menos 10 nm, al menos 20 nm, al menos 30 nm, al menos 50 nm, al menos 100 nm o al menos 200 nm.

35 En una realización particular, al menos algunas de la pluralidad de nanoentidades son nanocápsulas con un diámetro medio de menos de 1 micrómetro.

40 Otras nanoentidades

45 En algunos casos, la nanoentidad es una micela. Típicamente, una micela se forma a partir de una pluralidad de moléculas tensioactivas o anfifílicas que definen una parte interior y una exterior. Por ejemplo, las moléculas de tensioactivo están dispuestas para tener un exterior relativamente hidrófilo y una parte interior relativamente hidrófoba, por ejemplo, formada a partir de una capa única de tensioactivo o moléculas anfifílicas. En algunos casos, la micela tiene un tamaño en el intervalo nanométrico. La micela está, en algunas modalidades, compuesta por moléculas anfifílicas a una concentración por encima de la CMC (concentración micelar crítica) cuando las micelas se dispersan en una fase externa. Si la fase líquida externa es acuosa, la parte hidrófila de las moléculas anfifílicas

se orienta hacia la fase externa. En dependencia de la concentración de moléculas anfifílicas, las micelas pueden organizarse formando estructuras más grandes, que son agrupaciones de micelas. Las micelas se forman a partir de moléculas de tensioactivo, por ejemplo, con sus partes hidrófilas en la superficie y sus partes hidrófobas apuntando hacia adentro (o viceversa en algunos casos).

5 En algunos casos, la nanoentidad es un liposoma. Un liposoma puede tener una estructura similar, pero habitualmente se forma a partir de una doble capa de tensioactivo o moléculas anfifílicas (por ejemplo, una bicapa lipídica), y de esta manera puede definir una porción interna, una porción media y una capa externa; por ejemplo, la porción interna es relativamente hidrófila, la porción media (por ejemplo, la capa externa del liposoma, formada por la estructura bicapa del tensioactivo o moléculas anfifílicas) es relativamente hidrófoba y el exterior del liposoma es un ambiente acuoso o hidrófilo.

10 15 Si la porción interna de una nanoentidad es acuosa, el líquido acuoso que forma la porción interna puede estar compuesto por agua que contiene al menos una sal, en determinadas modalidades. Además, en algunas modalidades, el líquido acuoso que forma la porción interna puede contener uno o más estabilizadores, conservantes, tensioactivos, glicoles, polioles, azúcares, agentes espesantes, agentes gelificantes solubles en agua y mezclas de estos y/u otros excipientes adecuados. Estos excipientes se usan, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la formulación, ajustar la viscosidad de la composición final, controlar la velocidad de liberación de la fase acuosa interna o similares.

20 25 En algunas modalidades, la nanoentidad es una nanoemulsión. Las nanoemulsiones son dispersiones bifásicas de dos líquidos inmiscibles: ya sea gotas de agua en aceite (W/O) o aceite en agua (O/W) estabilizado por al menos un tensioactivo anfifílico apropiado, que forma gotas de tamaños nanométricos.

25 Núcleo central; compuesto hidrófobo

30 35 Como se usa en la presente descripción, la propiedad de ser "hidrófilo" se entiende como la propiedad constitucional de una molécula o grupo funcional para penetrar en la fase acuosa o permanecer en ella. En consecuencia, la propiedad de ser "hidrófobo" se entiende como una propiedad constitucional de una molécula o grupo funcional para exhibir un comportamiento exófilo con respecto al agua; es decir, mostrar tendencia a no penetrar en el agua o salir de la fase acuosa. Para más detalles se hace referencia a Römpf Lexikon Lacke und Druckfarben, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, N.Y., 1998, "Hydrophilicity", "Hydrophobicity", páginas 294 y 295. Como se usa en la presente descripción, la propiedad de ser "hidrófobo" puede usarse de manera intercambiable con la propiedad de ser "lipófilo". Sin embargo, se conoce que si bien las sustancias hidrófobas suelen ser lipófilas existen excepciones, tal como en el caso de las siliconas y los fluorocarbonos.

40 En algunas modalidades, el núcleo interno comprende al menos un compuesto hidrófobo, por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en aceite, tensioactivo lipófilo, ácido graso, alcano, cicloalcano, sal biliar, derivados de sales biliares, terpenoide, terpeno, porciones derivadas de terpenos y vitamina lipófilas.

45 50 55 60 El compuesto hidrófobo es particularmente un aceite. El aceite puede ser volátil o no volátil y, en una realización particular, se selecciona a partir de aceites naturales, farmacéuticos semisintéticos y sintéticos o una combinación de estos, tales como aceites animales, aceites vegetales, hidrocarburos o aceites de silicona. Estos aceites pueden seleccionarse a partir de aceites naturales, semisintéticos y sintéticos para uso farmacéutico, tales como aceites de origen vegetal o animal, aceites de hidrocarburos o aceites de silicona. Los aceites adecuados para llevar a cabo determinadas realizaciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, triglicérido caprílico/cáprico, aceite mineral, aceite de escualeno, aceites aromatizados, aceite de silicona, aceites esenciales, vitaminas insolubles en agua, estearato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de octilo, palmitato de cetilo, behenato de tridecilo, adipato de diisopropilo, sebacato de dioctilo, antranilato de mentilo, octanoato de cetilo, salicilato de octilo, miristato de isopropilo, neopentilo glicol dicaprato cetoles, oleato de decilo, lactatos de alquilo C12-C15, lactato de cetilo, lactato de laurilo, de isoestearilo neopentanoato, lactato de miristilo, estearato de isocetil estearoil, estearato de octildodecil estearoil, aceites de hidrocarburos, isoparafina, parafinas fluidas, isododecano, vaselina, aceite de argán, aceite de colza, aceite de chile, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de linaza, aceite de semilla de uva, aceite de mostaza, aceite de oliva, aceite de palma, aceite de palma fraccionado, aceite de cacahuete, aceite de ricino, aceite de piñón, aceite de semilla de amapola, aceite de semilla de calabaza, aceite de salvado de arroz, aceite de cártamo, aceite de árbol de té, aceite de trufa, aceite vegetal, aceite de semilla de albaricoque, aceite de jojoba, aceite de nuez de macadamia, aceite de germen de trigo, aceite de almendras, aceite de soja, aceite de semilla de sésamo, aceite de avellana, aceite de girasol, aceite de cáñamo, aceite de palo de rosa, aceite de nuez de Kukui, aceite de aguacate, aceite de nuez, aceite de pescado, aceite de bayas, aceite de pimienta de Jamaica, aceite de enebro, aceite de semilla, aceite de semilla de almendra, aceite de semilla de anís, aceite de semilla de apio, aceite de semilla de comino, aceite de semilla de nuez moscada, aceite de hoja de albahaca, aceite de hoja de laurel, aceite de hoja de canela, aceite de hoja de salvia común, aceite de hoja de eucalipto, aceite de hoja de limón, aceite de hoja de melaleuca, aceite de orégano, aceite de hoja de pachulí, aceite

de hoja de menta, aceite de aguja de pino, aceite de hoja de romero, aceite de menta verde, aceite de hoja de árbol de té, aceite de tomillo, aceite de flor, aceite de manzanilla, aceite de salvia, aceite de clavo, aceite de flor de geranio, aceite de flor de hisopo, aceite de jazmín, aceite de lavanda, aceite de flor de mauka, aceite de flor de mejorana, aceite de flor de naranja, aceite de flor de rosa, aceite de flor de ylang-ylang, aceite de corteza, aceite de corteza de casia, aceite de corteza de canela, aceite de corteza de sasafrás, aceite de madera, aceite de madera de alcanfor, aceite de madera de cedro, aceite de palo de rosa, aceite de sándalo, aceite de madera de jengibre, aceite de resina, aceite de ricino, aceite de mirra, aceite de cáscara, aceite de cáscara de bergamota, aceite de cáscara de pomelo, aceite de cáscara de limón, aceite de cáscara de lima, aceite de cáscara de naranja, aceite de cáscara de mandarina, aceite de raíz, aceite de valeriana, ácido oleico, ácido linoleico, alcohol oleílico, alcohol isoestearílico, oleato de etilo, triglicéridos de cadena media tales como mezclas de decanoil y octanoil glicéridos (Miglyol® 810N, Miglyol® 812N, Kollisolv® MCT, Captex® 300, Captex® 355, Labrafac® Lipophile WL1349), Labrafil® M 2125 CS (Linoleoil macrogol-6 glicéridos), Labrafil® M2130 CS (Linoleoil macrogol-6 glicéridos), Labrafil® M 1944 CS (oleoil polioxil-6 glicéridos), Labrafac® PG (propilen glicol dicaprilocaprato), Rylo® (mezcla de ácidos grasos), Peceol® (monooleato de glicerol) y Maisine® (monolinoleato de glicerol), derivados sintéticos o semisintéticos de estos y combinaciones de estos. En algunos casos, el aceite es uno o más de aceite de maní, aceite de semilla de algodón, aceite de oliva, aceite de ricino, aceite de soja, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de maíz, aceite de palma, alfa-tocoferol (vitamina E), miristato de isopropilo, escualeno, Miglyol®, Labrafil®, Labrafac®, Peceol®, Captex®, Kollisolv® MCT y Maisine® o mezclas de estos. Otros aceites adecuados incluyen aceites de la familia de los terpenos formados por unidades de isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno) y subdivididos de acuerdo con sus átomos de carbono: hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40, carotenoides) y politerpenos, vitamina A, escualeno, etcétera. En algunas modalidades, el líquido no acuoso que forma la porción interna puede contener estabilizantes insolubles en agua, conservantes, tensioactivos, disolventes orgánicos y mezclas de estos para proporcionar la máxima estabilidad de la formulación. Además son posibles combinaciones de uno o más de estos y/u otros aceites en diversas modalidades.

En una modalidad, el núcleo interno comprende un aceite, y particularmente un triglicérido caprílico/cáprico (tal como Miglyol® 812N).

Capa externa: polímero

La ventaja de los sistemas de nanocápsulas con respecto a los sistemas de emulsión es la presencia de un polímero que recubre los núcleos oleosos que puede conferir una mayor estabilidad y protección contra la agregación, un cambio en el perfil de liberación del fármaco asociado, una mayor internalización celular e interacción específica con determinados tipos de células. Puede usarse una variedad de polímeros de acuerdo con determinadas realizaciones de la invención.

En algunas realizaciones el polímero se selecciona del grupo que consiste en: ácido polisiálico (PSA), ácido hialurónico (HA), ácido poliglutámico (PGA) y/o ácido poliglutámico pegilado (PGA-PEG), ácido poliláctico (PLA) y/o ácido poliláctico pegilado (PLA-PEG), polí(ácido aspártico) (PASP) y/o polí(ácido aspártico) pegilado (PASP-PEG), polí(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y/o polí(ácido láctico-co-glicólico)pegilado (PLA-PEG), ácido algínico (ALG) y/o ácido algínico pegilado (ALG-PEG), ácido polimálico (PLMA) y/o ácido polimálico pegilado (PLMA-PEG), y mezclas de estos. Además se usan combinaciones de estos y/u otros polímeros en determinadas modalidades.

En realizaciones particulares, el polímero se selecciona del grupo que consiste en: ácido polisiálico, ácido hialurónico, ácido poliglutámico, ácido poliaspártico, ácido polimálico, ácido algínico, ácido poliláctico, ácido poliláctico-co-glicólico, formas pegiladas de estos y mezclas de estos. En realizaciones particulares, el polímero es PSA o HA.

El polímero se distribuye uniformemente por toda la entidad o se concentra dentro de determinadas regiones de la entidad, por ejemplo, en la capa externa de una cápsula u otra superficie externa de una entidad. En algunos casos, al menos el 50 % en peso de una porción de una entidad, tal como una cubierta, comprende el polímero y, en determinados casos, al menos el 60 % en peso, al menos el 70 % en peso, al menos el 75 % en peso, al menos el 80 % en peso, al menos el 85 % en peso, al menos el 90 % en peso, al menos el 95 % en peso, o al menos el 99 % en peso de la porción de la entidad puede comprender el polímero.

Polímero - PSA

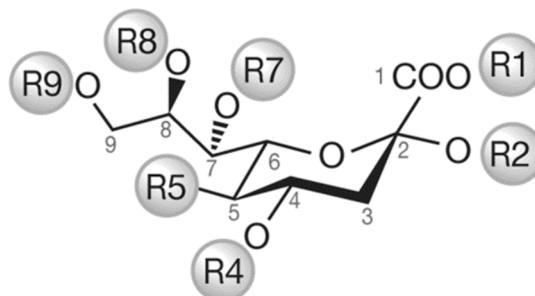
En una realización particular, el polímero es PSA. El PSA se compone generalmente de una pluralidad de unidades de ácido siálico, a menudo unidas entre sí para formar un polímero mediante enlaces 2-->8 y/o 2-->9, aunque también son posibles otras disposiciones de enlace. Típicamente, hay al menos 2, al menos 4, al menos 6, al menos 8, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 75, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400 o al menos 500 unidades de ácido siálico unidas entre sí para formar PSA. En algunos casos, el PSA no tiene más de 1000, no más de 500, no más de 200, no más de 100,

no más de 50, no más de 30 o no más de 10 unidades de ácido siálico unidas entre sí para formar el PSA. Además, son posibles combinaciones de cualquiera de estos, por ejemplo, un PSA tiene entre 2 y 100 unidades de ácido siálico que están unidas entre sí. Debe notarse que las unidades de ácido siálico no necesitan ser idénticas y pueden ser independientemente iguales o diferentes, incluso dentro de la misma molécula de PSA. Debe notarse además, que un PSA no tiene por qué ser necesariamente una cadena lineal (lineal), y también son posibles varias disposiciones de ramificación. Por ejemplo, una unidad de ácido siálico se une a 3 o más unidades de ácido siálico diferentes, de esta manera se crea un punto de ramificación dentro de la molécula de PSA.

Como ejemplos no limitantes, el PSA tiene diferentes pesos moleculares, por ejemplo, 4 kDa, 30 kDa, 95 kDa, etcétera. En algunos casos, el PSA contiene más de 300 unidades de ácido siálico. Como ejemplos adicionales no limitantes, el PSA tiene un peso molecular de al menos 1 kDa, al menos 3 kDa, al menos 5 kDa, al menos 10 kDa, al menos 20 kDa, al menos 25 kDa, al menos 30 kDa, al menos 40 kDa, al menos 50 kDa, al menos 60 kDa, al menos 70 kDa, al menos 75 kDa, al menos 80 kDa, al menos 90 kDa, al menos 100 kDa, etcétera. En algunos casos, el PSA tiene un peso molecular de no más de 100 kDa, no más de 90 kDa, no más de 80 kDa, no más de 75 kDa, no más de 70 kDa, no más de 60 kDa, no más de 50 kDa, no más de 40 kDa, no más de 30 kDa, no más de 25 kDa, no más de 20 kDa, no más de 10 kDa, no más de 5 kDa, no más de 3 kDa o no más de 1 kDa. Además son posibles combinaciones de cualquiera de estos, por ejemplo, el PSA tiene un peso molecular entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa, entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 80 kDa, o entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 50 kDa, etcétera. (A menos que se indique lo contrario, los pesos moleculares descritos en la presente descripción son pesos moleculares promedio en número).

Debe notarse además que los ácidos polisiálico no tienen por qué ser siempre idénticos. Por ejemplo, en algunas modalidades, los PSA tienen diferentes números de unidades de ácido siálico y/o hay diferentes unidades de ácido siálico en diferentes moléculas de PSA que están presentes. En algunos casos, pueden estar presentes uno o unos pocos tipos de moléculas de PSA, por ejemplo, una o más formas comprenden al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o más de las moléculas de PSA que están presentes, es decir, sobre una base molar.

Los ejemplos no limitantes de unidades de ácido siálico que están presentes dentro de un PSA incluyen, pero no se limitan a, ácido N-acetilneuramínico (Neu), ácido 2-ceto-3-desoxinónico (Kdn), ácido lactamínico, ácido N-siálico, y/o ácido O-siálico. Otros ejemplos incluyen N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), ácido 9-O-acetil-8-O-metil-N-acetilneuramínico (Neu5,9Ac28Me), y ácido 7,8,9-tri-O-acetil-N-glicolilneuramínico (Neu5Gc7,8,9Ac3). "Sia" generalmente indica una unidad de ácido siálico no especificada. En algunas modalidades, las unidades de ácido siálico incluyen cualquier derivado del ácido neuramínico (un azúcar de 9 carbonos), que incluye los 43 derivados que se encuentran típicamente en la naturaleza. Estos incluyen, pero no se limitan a, Neu; Neu5Ac; Neu4,5Ac2; Neu5,7Ac2; Neu5,8Ac2; Neu5,9Ac2; Neu4,5,9Ac3; Neu5,7,9Ac3; Neu5,8,9Ac3; Neu5,7,8,9Ac4; Neu5Ac9Lt; Neu4,5Ac29Lt; Neu5Ac8Me; Neu5,9Ac28Me; Neu5Ac8S; Neu5Ac9P; Neu2en5Ac; Neu2en5,9Ac2; Neu2en5Ac9Lt; Neu2,7an5Ac; Neu5Gc; Neu4Ac5Gc; Neu7Ac5Gc; Neu8Ac5Gc; Neu9Ac5Gc; Neu7,9Ac25Gc; Neu8,9Ac25Gc; Neu7,8,9Ac35Gc; Neu5Gc9Lt; Neu5Gc8Me; Neu9Ac5Gc8Me; Neu7,9Ac25Gc8Me; Neu5Gc8S; Neu5GcAc; Neu5GcMe; Neu2en5Gc; Neu2en9Ac5Gc; Neu2en5Gc9Lt; Neu2en5Gc8Me; Neu2,7an5Gc; Neu2,7an5Gc8Me; Kdn; y Knd9Ac. En un conjunto de modalidades, cada una de las unidades de ácido siálico (antes de la polimerización para formar PSA) puede tener independientemente la siguiente estructura:



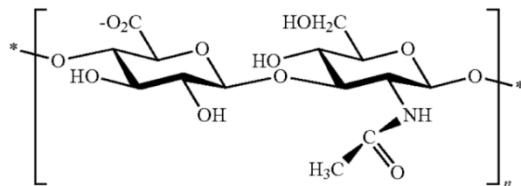
45
 R1 es H; un enlace alfa a Gal(3/4/6), GalNAc(6) (N-acetilgalactosamina), GlcNAc(4/6), Sia (8/9), o 5-O-Neu5Gc; un oxígeno unido a C-7 en la molécula 2,7-anhidro; o un hidroxilo anomérico eliminado en Neu2en5Ac (doble enlace a C-3). R2 es H; un enlace alfa a Gal(3/4/6), GalNAc(6), GlcNAc(4/6), Sia (8/9), o 5-O-Neu5Gc; un oxígeno unido a C-7 en la molécula 2,7-anhidro; o un hidroxilo anomérico eliminado en Neu2en5Ac (doble enlace a C-3). R4 es H; -acetilo; un anhidro a C-8; Fuc (fucosa); o Gal (galactosa). R5 es un amino; N-acetilo; N-glicolilo; hidroxilo; N-acetimidoilo; N-glicolil-O-acetilo; N-glicolil-O-metilo; o N-glicolil-O-2-Neu5Gc. R7 es H; -acetilo; un anhidro a C-2; o sustituido por amino y N-acetilo en Leg (ácido legionamínico). R8 es H; -acetilo; un anhidro a C-4; -metilo; -sulfato;

Sia (ácido siálico); o Glc (glucosa). R9 es H; -acetilo; -lactilo; -fosfato; -sulfato; Sia; u OH sustituido por H en Leg. En algunos casos, el PSA es ácido colomínico (donde solo hay enlaces 2-->8).

Como se usa en la presente descripción, el ácido siálico incluye, pero no se limita a, sales solubles en agua y derivados solubles en agua del ácido siálico. Por ejemplo, la sal de ácido siálico es la sal de sodio, la sal de potasio, la sal de magnesio, la sal de calcio o la sal de zinc. En una modalidad, al menos una parte del ácido siálico está presente como sal de sodio. Además, se usan combinaciones de múltiples tipos de ácidos siálico, por ejemplo, como subunidades de un PSA y/o como diferentes moléculas de PSA. En un conjunto de modalidades, se modifica al menos parte del ácido siálico dentro del PSA (sin embargo, debe entenderse que en otras modalidades, el PSA no se modifica necesariamente). Por ejemplo, en algunos casos, una o más unidades de ácido siálico se modifican, por ejemplo, mediante la unión a polietilenglicol, alquilo u otras porciones hidrófobas, o similares. Las porciones hidrófobas incluyen moléculas hidrófobas o porciones de estas, por ejemplo, un grupo alquilo, tales como los que se describen en la presente descripción.

15 Polímero - Ácido hialurónico, HA

En un conjunto de modalidades, el polímero comprende ácido hialurónico. El ácido hialurónico es un polímero lineal que comprende la repetición de una estructura de disacárido formada por la adición alterna de ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina unida por enlaces glucosídicos beta-1,4 y beta-1,3 alternados como se muestra en la siguiente fórmula:



20 donde el número entero n representa el grado de polimerización, es decir, el número de unidades de disacárido en la cadena de ácido hialurónico. Por ejemplo, n es al menos 2, al menos 4, al menos 6, al menos 8, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 75, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400 o al menos 500. En algunos casos, n no es más de 1000, no más de 500, no más de 200, no más de 100, no más de 50, no más de 30 o no más de 10. Además, son posibles combinaciones de cualquiera de estos, por ejemplo, n está entre 2 y 100. Debe notarse que las unidades de ácido hialurónico no necesitan ser idénticas, y pueden ser independientemente iguales o diferentes, incluso dentro de la misma cadena de ácido hialurónico. Debe notarse además que el ácido hialurónico no tiene por qué ser necesariamente una cadena lineal (lineal), y también son posibles varias disposiciones de ramificación.

25 Por lo tanto, puede usarse ácido hialurónico con un amplio intervalo de pesos moleculares. Como ejemplos no limitantes, el ácido hialurónico tiene diferentes pesos moleculares, por ejemplo, 4 kDa, 30 kDa, 95 kDa, etcétera. Por ejemplo, el ácido hialurónico tiene un peso molecular de al menos 1 kDa, al menos 3 kDa, al menos 5 kDa, al menos 10 kDa, al menos 20 kDa, al menos 25 kDa, al menos 30 kDa, al menos 40 kDa, al menos 50 kDa, al menos 60 kDa, al menos 70 kDa, al menos 75 kDa, al menos 80 kDa, al menos 90 kDa, al menos 100 kDa, etcétera. En algunos casos, el ácido hialurónico tiene un peso molecular de no más de 100 kDa, no más de 90 kDa, no más de 80 kDa, no más de 75 kDa, no más de 70 kDa, no más de 60 kDa, no más de 50 kDa, no más de 40 kDa, no más de 30 kDa, no más de 25 kDa, no más de 20 kDa, no más de 10 kDa, no más de 5 kDa, no más de 3 kDa o no más de 1 kDa. Además, son posibles combinaciones de cualquiera de estos, por ejemplo, el ácido hialurónico tiene un peso molecular entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa, entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 80 kDa, o entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 50 kDa, etcétera.

30 35 40 45 50 El ácido hialurónico, como se usa en la presente descripción, también incluye su base conjugada (hialuronato). Esta base conjugada puede ser una sal alcalina de ácido hialurónico que incluye sales inorgánicas tales como, por ejemplo, sal de sodio, sal de potasio, sal de calcio, sal de amonio, sal de magnesio, sal de aluminio y sal de litio, sales orgánicas tales como sales de aminoácidos básicos en condiciones de pH neutro. En algunos casos, las sales son aceptables farmacéuticamente. En una modalidad, la sal alcalina es la sal sódica del ácido hialurónico. Además, se usan combinaciones de múltiples tipos de ácido hialurónico, por ejemplo, como subunidades de una cadena de ácido hialurónico y/o como diferentes moléculas de ácido hialurónico.

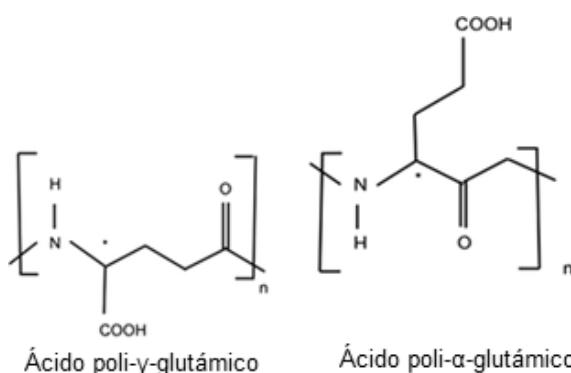
55 Por lo tanto, los ácidos hialurónicos no tienen por qué ser siempre idénticos. Por ejemplo, en algunas modalidades, los ácidos hialurónicos tienen diferentes números de unidades de ácido hialurónico (tales como las descritas anteriormente) y/o hay diferentes unidades de ácido hialurónico en diferentes cadenas de ácido hialurónico que están presentes. En algunos casos, están presentes uno o más tipos de moléculas de ácido hialurónico, por ejemplo, una o más formas comprenden al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos

70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o más de las moléculas de ácido hialurónico que están presentes, es decir, sobre una base molar.

En algunas modalidades, al menos algunas de las unidades de ácido hialurónico están modificadas (sin embargo, debe entenderse que en otras modalidades, el ácido hialurónico no está necesariamente modificado). Por ejemplo, en algunos casos, una o más unidades de ácido hialurónico se modifican, por ejemplo, mediante la unión a polietilenglicol, alquilo u otras porciones hidrófobas, o similares. Las porciones hidrófobas incluyen moléculas hidrófobas o porciones de estas, por ejemplo, un grupo alquilo, tales como los que se describen en la presente descripción.

10 Polímero - Ácido poliglutámico, PGA

En un conjunto de modalidades, el polímero comprende ácido poliglutámico (PGA). El PGA es un polímero del aminoácido ácido glutámico (GA). Aparte del peso molecular (Mw), la relación de monómeros de ácido glutámico D- a L y la estructura molecular son características químicas importantes del PGA. El PGA existe como dos estructuras diferentes, como se muestra más abajo:



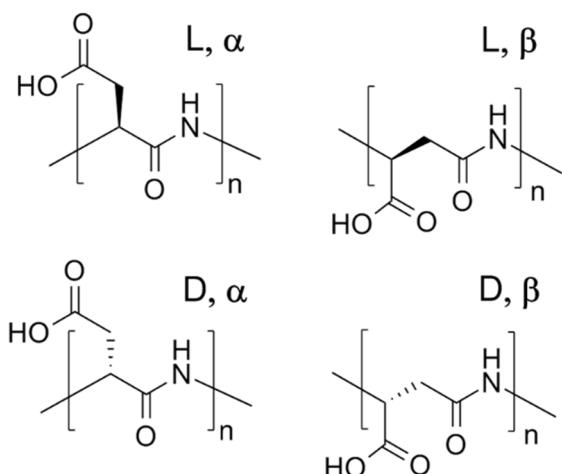
20 donde el número entero n representa el grado de polimerización, es decir, el número de monómeros de ácido glutámico en la cadena de PGA. Por ejemplo, n es al menos 2, al menos 4, al menos 6, al menos 8, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 75, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400 o al menos 500. En algunos casos, n no es más de 1000, no más de 500, no más de 200, no más de 100, no más de 50, no más de 30 o no más de 10. Por lo tanto, pueden usarse ácidos poliglutámicos con una amplia gama de pesos moleculares. Como ejemplos no limitantes, el ácido poliglutámico tiene diferentes pesos moleculares, por ejemplo, el ácido poliglutámico tiene un peso molecular de al menos 1 kDa, al menos 3 kDa, al menos 5 kDa, al menos 10 kDa, al menos 20 kDa, al menos 25 kDa, al menos 50 kDa, al menos 60 kDa, al menos 70 kDa, al menos 80 kDa, al menos 90 kDa, al menos 100 kDa, etcétera. Además, son posibles combinaciones de cualquiera de estos. Debe notarse, además, que las unidades glutámicas no necesitan ser necesariamente una cadena lineal (lineal), y también son posibles varias disposiciones de ramificación.

30 El ácido poli- α -glutámico (α -PGA) puede sintetizarse químicamente, mientras que γ -PGA solo puede obtenerse mediante producción microbiana.

35 Como se usa en la presente descripción, el ácido poliglutámico incluye, pero no se limita a, sales solubles en agua y derivados solubles en agua del ácido poliglutámico (por ejemplo, sal de sodio, sal de potasio, sal de magnesio, sal de calcio). En un conjunto de modalidades, al menos algunos de los ácidos glutámico dentro del PGA se modifican (sin embargo, debe entenderse que en otras modalidades, el PGA no se modifica necesariamente). Por ejemplo, en algunos casos, una o más unidades de ácido glutámico se modifican, por ejemplo, mediante la unión a polietilenglicol, alquilo u otras porciones hidrófobas, o similares.

40 Polímero - Ácido poliaspártico, PASP

45 En un conjunto de modalidades, el polímero comprende ácido poliaspártico (PASP). El PASP es un polímero de aminoácido con un enlace amida similar a una proteína en su estructura y un ácido carboxílico como grupo colgante en cada unidad repetida. En la naturaleza, el PASP se ha encontrado como fragmentos de proteínas más grandes con una longitud de hasta 50 aminoácidos. El PASP puede sintetizarse mediante diferentes métodos. El polímero está presente en diferentes formas tales como α , β e isómeros L, D.

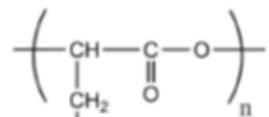
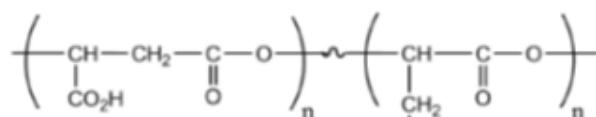


donde el número entero n representa el grado de polimerización, es decir, el número de monómeros de ácido aspártico en la cadena PASP. Dentro del polímero está presente cualquier número de unidades de ácido aspártico. Por ejemplo, n es al menos 2, al menos 4, al menos 6, al menos 8, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 75, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400 o al menos 500. En algunos casos, n no es más de 1000, no más de 500, no más de 200, no más de 100, no más de 50, no más de 30 o no más de 10. Como ejemplos no limitantes, el ácido poliglutámico tiene diferentes pesos moleculares, por ejemplo, el ácido poliglutámico tiene un peso molecular de al menos 1 kDa, al menos 3 kDa, al menos 5 kDa, al menos 10 kDa, al menos 20 kDa, al menos 25 kDa, al menos 50 kDa, al menos 60 kDa, al menos 70 kDa, al menos 80 kDa, al menos 90 kDa, al menos 100 kDa, etcétera. Además, son posibles combinaciones de cualquiera de estos. Debe notarse además que pueden estar presentes otros aminoácidos dentro de la cadena PASP, y el polímero es lineal o ramificado.

Como se usa en la presente descripción, el ácido poliaspártico incluye, pero no se limita a, sales solubles en agua y derivados solubles en agua del ácido poliaspártico (por ejemplo, sal de sodio, sal de potasio, sal de magnesio, sal de calcio). En un conjunto de modalidades, al menos algunos de los ácidos aspárticos del PASP están modificados (sin embargo, debe entenderse que en otras modalidades, el PASP no se modifica necesariamente). Por ejemplo, en algunos casos, una o más unidades de ácido aspártico se modifican, por ejemplo, mediante unión a polietilenglicol, alquilo u otras porciones hidrófobas, o similares.

Polímero - Ácido polimálico, PMLA

En un conjunto de modalidades, el polímero comprende ácido polimálico (PMLA). El PLMA es un poliéster con funcionalidad carboxílica que puede producirse mediante síntesis química o fermentación biológica a partir del moho de lodo *Physarum polycephalum*. El PMLA es un polímero completamente biodegradable que se metaboliza en agua y dióxido de carbono en el ciclo del ácido cítrico. Tanto las estructuras α como las β , racémicas u ópticamente puras, pueden obtenerse por métodos químicos, mientras que los microorganismos generan exclusivamente PMLA de pureza óptica extremadamente alta. Los grupos de ácido carboxílico colgantes pueden modificarse químicamente para introducir moléculas de interés. La estructura de las diferentes formas del PLMA se muestra más abajo:

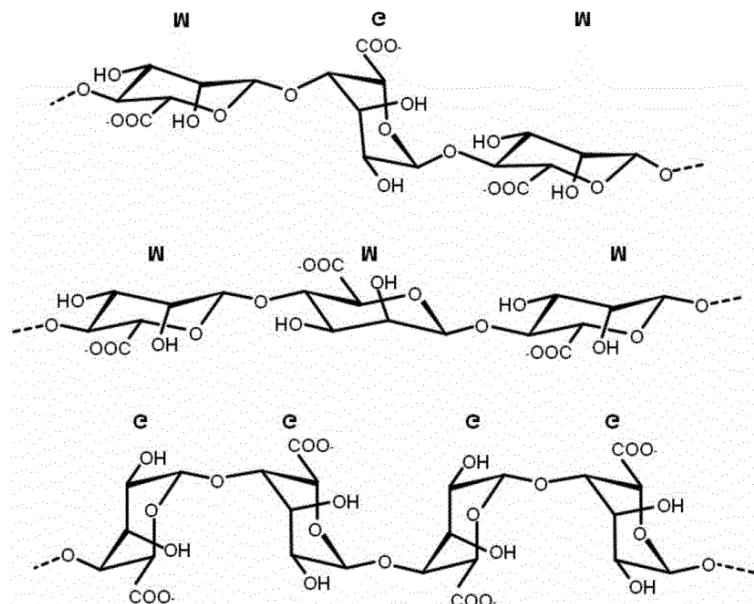
poli(ácido β -málico)poli(ácido α -málico)poli(ácido α,β -málico)

donde el número entero n representa el grado de polimerización, es decir, el número de unidades de ácido málico en la cadena del PLMA. Por ejemplo, n es al menos 2, al menos 4, al menos 6, al menos 8, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 75, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400 o al menos 500. En algunos casos, n no es más de 1000, no más de 500, no más de 200, no más de 100, no más de 50, no más de 30 o no más de 10. Por lo tanto, pueden usarse ácidos polimálico con una amplia gama de pesos moleculares. Como ejemplos no limitantes, el ácido polimálico tiene diferentes pesos moleculares, por ejemplo, el ácido polimálico tiene un peso molecular de al menos 1 kDa, al menos 3 kDa, al menos 5 kDa, al menos 10 kDa, al menos 20 kDa, al menos 25 kDa, al menos 50 kDa, al menos 60 kDa, al menos 70 kDa, al menos 80 kDa, al menos 90 kDa, al menos 100 kDa, etcétera. Además, son posibles combinaciones de cualquiera de estos. Debe notarse además que las unidades de ácido málico no necesitan ser necesariamente una cadena lineal (lineal), y también son posibles varias disposiciones de ramificación.

Como se usa en la presente descripción, el ácido polimálico incluye, pero no se limita a, sales solubles en agua y derivados solubles en agua del ácido polimálico (por ejemplo, sal de sodio, sal de potasio, sal de magnesio, sal de calcio). En un conjunto de modalidades, al menos algunos de los ácidos málicos dentro del PLMA se modifican (sin embargo, debe entenderse que en otras modalidades, el PLMA no se modifica necesariamente). Por ejemplo, en algunos casos, una o más unidades de ácido málico se modifican, por ejemplo, mediante unión a polietilenglicol, alquilo u otras porciones hidrófobas, o similares.

Polímero - Ácido algínico, ALG

En un conjunto de modalidades, el polímero comprende ácido algínico (ALG). El ALG es un polisacárido hidrófilo distribuido ampliamente en las paredes celulares de las algas pardas. Sus sales se conocen como alginatos. Los alginatos son en realidad copolímeros de bloque y la proporción de guluronato a manuronato varía en dependencia de la fuente natural. Se conoce que el alginato es una familia completa de copolímeros lineales que contienen bloques de residuos de β -D-manuronato (M) y α -L-guluronato (G) enlazados (1,4). Los bloques se componen de residuos G consecutivos (GGGGGG), residuos M consecutivos (MMMMMM) y residuos M y G alternos (GMGMGM), como se representa más abajo (Lee y Mooney, 2012).

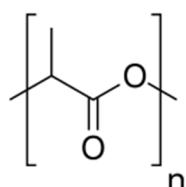


Como ejemplos no limitantes, el ácido algínico tiene diferentes pesos moleculares, por ejemplo, el alginato tiene un peso molecular de al menos 1 kDa, al menos 3 kDa, al menos 5 kDa, al menos 10 kDa, al menos 20 kDa, al menos 25 kDa, al menos 50 kDa, al menos 60 kDa, al menos 70 kDa, al menos 80 kDa, al menos 90 kDa, al menos 100 kDa, etcétera. Además, son posibles combinaciones de cualquiera de estos.

Como se usa en la presente descripción, el ácido algínico incluye, pero no se limita a, sales solubles en agua y derivados solubles en agua del ácido algínico (por ejemplo, sal de sodio, sal de potasio, sal de magnesio, sal de calcio). En un conjunto de modalidades, al menos algunos de los residuos de guluronato y/o manuronato dentro de ALG están modificados (sin embargo, debe entenderse que en otras modalidades, el ALG no se modifica necesariamente). Por ejemplo, en algunos casos, uno o más residuos de guluronato y/o manuronato se modifican, por ejemplo, mediante unión a polietilenglicol, alquilo u otras porciones hidrófobas, o similares.

Polímero - Ácido poliláctico, PLA

En un conjunto de modalidades, el polímero comprende el poliéster de ácido poliláctico (PLA). La estructura del PLA se muestra más abajo:

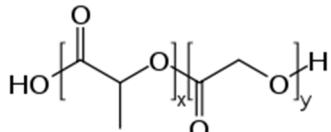


donde el número entero n representa el grado de polimerización, es decir, el número de unidades de ácido láctico/láctido en la cadena de PLA. Por ejemplo, n es al menos 2, al menos 4, al menos 6, al menos 8, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 75, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400 o al menos 500. En algunos casos, n no es más de 1000, no más de 500, no más de 200, no más de 100, no más de 50, no más de 30 o no más de 10. Por lo tanto, puede usarse PLA con una amplia gama de pesos moleculares. Como ejemplos no limitantes, el PLA tiene diferentes pesos moleculares, por ejemplo, el PLA tiene un peso molecular de al menos 1 kDa, al menos 3 kDa, al menos 5 kDa, al menos 10 kDa, al menos 20 kDa, al menos 25 kDa, al menos 50 kDa, al menos 60 kDa, al menos 70 kDa, al menos 80 kDa, al menos 90 kDa, al menos 100 kDa, etcétera. Además, son posibles combinaciones de cualquiera de estos. Debe notarse además que las unidades de ácido láctico/láctido no necesitan ser necesariamente una cadena lineal (lineal), y además son posibles varias disposiciones de ramificación.

Polímero - Poliláctico-co-glicólico, PLGA

En un conjunto de modalidades, el polímero comprende el poliéster poliláctico-co-glicólico (PLGA). La estructura del PLGA se muestra más abajo:

5

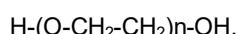


donde el número entero x representa el número de unidades de ácido láctico y el número entero y representa el número de unidades de ácido glicólico. En dependencia de la relación de láctico a glicólico usada para la polimerización, pueden obtenerse diferentes formas del PLGA, que habitualmente se identifican con respecto a la relación molar de los monómeros usados. Como ejemplos no limitantes, el PLGA es 75:25 (copolímero cuya composición es 75 % ácido láctico y 25 % ácido glicólico), 50:50 (copolímero cuya composición es 50 % ácido láctico y 50 % ácido glicólico), y 25:75 (copolímero cuya composición es 25 % de ácido láctico y 75 % de ácido glicólico).

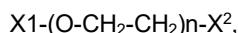
10 15 En algunos casos, uno o más monómeros de ácido láctico y/o ácido glicólico en el PLA o el PLGA se modifican, por ejemplo, mediante unión a polietilenglicol, alquilo u otras porciones hidrófobas, o similares.

Polímeros pegilados, Polímeros-PEG

20 25 En un conjunto de modalidades, el polímero comprende poli(etilenglicol) (PEG). Por lo tanto, en algunos casos, el PEG se conjuga con, por ejemplo, HA, PGA, PASP, PLMA, ALG, PLA o PLGA, por ejemplo, para formar HA-PEG, PGA-PEG, PASP-PEG, PLMA-PEG, ALG-PEG, PLA-PEG o PLGA-PEG. Sin embargo, en otros casos, el PEG está presente, es decir, no está conjugado con los polímeros. El PEG, en su forma más común, es un polímero que tiene una fórmula:



donde n es un número entero que representa el grado de polimerización del PEG. Para la formación del conjugado polímero-PEG, se modifican uno o dos de los dos grupos hidroxilo terminales. Los PEG modificados, por ejemplo, como sigue:



50 55 donde X_1 es hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo que bloquea la función del radical OH para reacciones posteriores. Por ejemplo, n es al menos 2, al menos 4, al menos 6, al menos 8, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 75, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400 o al menos 500. En algunos casos, n no es más de 1000, no más de 500, no más de 200, no más de 100, no más de 50, no más de 30 o no más de 10. Además, son posibles combinaciones de cualquiera de estos, por ejemplo, n está entre 2 y 100. Los grupos protectores de radicales hidroxilo son ampliamente conocidos en la técnica.

55 60 La pegilación de los polímeros puede realizarse mediante el uso de cualquier método adecuado disponible en la técnica. Tales polímeros están disponibles en una variedad de pesos moleculares. Por ejemplo, un peso molecular adecuado para PEG o Polímero-PEG está entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa, entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 80 kDa, entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 50 kDa. Como ejemplos adicionales no limitantes, el PEG o Polímero-PEG tiene un peso molecular de al menos 1 kDa, al menos 5 kDa, al menos 10 kDa, al menos 20 kDa, al menos 30 kDa, al menos 40 kDa, al menos 50 kDa, al menos 60 kDa, al menos 70 kDa, al menos 80 kDa, al menos 90 kDa, al menos 100 kDa, etcétera. Además, son posibles combinaciones de cualquiera de estos.

65 70 En algunas modalidades, la proporción de PEG en el polímero (por ejemplo, HA, PGA, PASP, PLMA, ALG, PLA, PLGA, etcétera) puede estar entre aproximadamente 10 % y 90 % (p/p) con respecto al peso total del polímero, entre aproximadamente 15 % y 80 %, entre aproximadamente 20 % y 70 %, o aproximadamente 20 %, aproximadamente 22 %, aproximadamente 24 %, aproximadamente 26 %, aproximadamente 28 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 32 %, aproximadamente 34 %, aproximadamente 36 %, aproximadamente 38 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 42 %, aproximadamente 44 %, aproximadamente 46 %, aproximadamente 48 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 52 %, aproximadamente 54 %, aproximadamente 56 %, aproximadamente 58 %, o aproximadamente 60 %.

Porción de direccionamiento

5 En una modalidad, la entidad comprende, además, una porción de direccionamiento, aunque debe notarse que en algunas modalidades, no está presente ninguna porción de direccionamiento. La porción de direccionamiento (si está presente) se usa para dirigir el suministro de entidades, por ejemplo, a determinadas poblaciones de células dentro de un sujeto. Por ejemplo, la porción de direccionamiento facilita el acceso de las nanoentidades a uno o más tipos de células, por ejemplo, una célula cancerosa, una célula endotelial y/o una célula inmunitaria. En algunas modalidades, la porción de direccionamiento permite dirigir la entidad a una ubicación específica dentro del sujeto, 10 por ejemplo, un órgano específico o un tipo celular específico (por ejemplo, a un tumor o células cancerosas). En algunos casos, las entidades son internalizadas por las células sin necesidad de porciones de direccionamiento y en algunos otros casos, la internalización es facilitada por la porción de direccionamiento. En algunas modalidades, está presente más de un tipo de porción de direccionamiento. En algunas modalidades, una porción de direccionamiento incluye un péptido que penetra en células y/o tumores/tejidos. Sin embargo, debe entenderse que 15 en determinadas modalidades, la porción de direccionamiento no necesariamente puede también facilitar la internalización.

20 Puede usarse una amplia variedad de porciones de direccionamiento en diversas modalidades. Por ejemplo, las porciones de direccionamiento incluyen péptidos, proteínas, aptámeros, anticuerpos (que incluyen anticuerpos monoclonales, nanocuerpos y fragmentos de anticuerpos), ácidos nucleicos, moléculas orgánicas, ligandos o similares. Pueden verse algunas porciones de direccionamiento, por ejemplo, en Bertrand, y otros, 2014, y otros, 2016, y Zhou y otros, 2016.

25 En un conjunto de modalidades, por ejemplo, la porción de direccionamiento es un péptido, por ejemplo, que tiene una longitud de no más de 50 aminoácidos, no más de 40 aminoácidos, no más de 30 aminoácidos, no más de 20 aminoácidos o no más de 10 aminoácidos.

30 En un conjunto de modalidades, la porción de direccionamiento es un péptido que penetra en las células y/o en el tumor/tejido. Un péptido que penetra en las células tiene la capacidad de penetrar una membrana celular. Un péptido que penetra en el tumor tiene la capacidad de favorecer la penetración profunda de la carga útil del fármaco en el tumor. En algunos casos, el péptido que penetra en las células y/o en los tumores/tejidos también facilita el direccionamiento de las nanoentidades hacia las células.

35 Los "aminoácidos naturales", como se usan en la presente descripción, son los 20 aminoácidos que se encuentran comúnmente en la naturaleza, típicamente en el isómero L, es decir, alanina ("Ala" o "A"), arginina ("Arg" o "R"), asparagina ("Asn" o "N"), ácido aspártico ("Asp" o "D"), cisteína ("Cys" o "C"), glutamina ("Gln" o "Q"), ácido glutámico ("Glu" o "E"), glicina ("Gly" o "G"), histidina ("His" o "H"), isoleucina ("Ile" o "I"), leucina ("Leu" o "L"), Lisina ("Lys" o "K"), metionina ("Met" o "M"), fenilalanina ("Phe" o "F"), prolina ("Pro" o "P"), serina ("Ser" o "S"), treonina ("Thr" o "T"), triptófano ("Trp" o "W"), tirosina ("Tyr" o "Y") y valina ("Val" o "V").

40 40 Pueden encontrarse algunos péptidos que penetran en los tumores/tejidos, por ejemplo, en Ruoslahti 2017. Por ejemplo, los péptidos pueden incluir un motivo de secuencia C-terminal "Regla del C terminal" (CendR) (R/K)XX(R/K) que se asocia con la capacidad de mejorar la permeabilidad de los vasos sanguíneos del tumor y los tejidos del tumor mediante la unión a receptores, tales como por ejemplo neuropilina-1 (NRP-1). Cada X en esta secuencia es independientemente un aminoácido o ningún aminoácido.

45 En algunos casos, la porción de direccionamiento comprende una secuencia Z1X1X2Z2, donde Z1 es R o K, Z2 es R o K, y X1 y X2 son cada uno independientemente un residuo de aminoácido o ningún residuo de aminoácido. En algunos casos, uno o ambos extremos del péptido comprenden otros aminoácidos, por ejemplo, como en las estructuras J1Z1X1X2Z2, Z1X1X2Z2J2, o J1Z1X1X2Z2J2, donde cada uno de J1 y J2 es independientemente una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más residuos de aminoácidos) o una cadena de carbono alifático. La cadena de carbono alifático contiene átomos de carbono y hidrógeno en cualquier secuencia adecuada, por ejemplo, de cadena lineal o ramificada, y está saturada o insaturada. Por ejemplo, en un conjunto de modalidades, la cadena de carbono alifático es una cadena de alquilo lineal que tiene una fórmula, por ejemplo, -(CH₂)_n, n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 u otro número entero positivo. Además, en algunos casos, la secuencia termina con un residuo de cisteína, por ejemplo, como en CJ1Z1X1X2Z2, CZ1X1X2Z2J2, o CJ1Z1X1X2Z2J2.

50 60 Los ejemplos no limitantes de péptidos CendR incluyen pero no se limitan a Lyp-1, cLyp1, tLyp-1, iNGR, iRGD, RPAPR, TT1, linear TT1, F3, o CRGRRST. Opcionalmente, también están presentes otros aminoácidos en el péptido. Lyp-1 tiene una secuencia CGNKRTG (SEQ ID NO: 1). En algunas modalidades, los dos residuos de Cys se unen entre sí mediante un puente disulfuro, de este modo se forma una estructura circular, por lo que también se conoce como cLyp-1. En algunos casos, solo está presente una porción de la secuencia Lyp-1, por

ejemplo, como en el caso de Lyp-1 o tLyp-1 truncado (CGNKRTR) (SEQ ID NO: 2). iNGR tiene una secuencia CRNNGRPDC (SEQ ID NO: 4), donde las dos cisteínas están unidas. iRGD tiene una secuencia (CRGDKGPDC) (SEQ ID NO: 5), donde las dos cisteínas están unidas entre sí, e iRGD2 tiene una secuencia CRGDRGPDC (SEQ ID NO: 6). RPAPAR tiene una secuencia RPAPAR (SEQ ID NO: 7). TT1 tiene una secuencia CKRGARSTC (SEQ ID NO: 8), donde las dos cisteínas están unidas. El TT1 lineal tiene una secuencia AKRGARSTA (SEQ ID NO: 9). F3 tiene una secuencia KDEPQRSSARLSAKPAPPKPEPKPKKAPAKK (SEQ ID NO: 32). CRGRRST tiene una secuencia CRGRRST (SEQ ID NO: 3)

En algunas modalidades, la porción de direccionamiento comprende el motivo de secuencia RGD de unión a integrina, que se une a integrinas expresadas en células endoteliales tumorales. Opcionalmente, también pueden estar presentes otros aminoácidos en el péptido. Pueden usarse péptidos RGD tanto lineales como cílicos como porciones de direccionamiento. La ciclación de péptidos RGD puede realizarse, por ejemplo, mediante conectores tales como disulfuro S-S, tioéter y anillos aromáticos rígidos. Pueden encontrarse algunos péptidos y derivados de RGD, por ejemplo, en Kapp, y otros, 2017. Los ejemplos no limitantes de péptidos RGD incluyen, pero no se limitan a, RGD, RGDS (SEQ ID NO: 14), GRGD (SEQ ID NO: 15), GRGDS (SEQ ID NO: 16), GRGDSP (SEQ ID NO: 13), GRGDSPK (SEQ ID NO: 26), GRGDNP (SEQ ID NO: 27), GRGDTP (SEQ ID NO: 28), RGD-4C (CDCRGDCFC, SEQ ID NO: 11), RGD-10 (GARYCRGDCFDGR, SEQ ID NO: 12), pentapéptidos cílicos RGD, hexapéptidos cílicos, Cilengitida (c(RGDf(NMe)V)) o el péptido iRGD CendR mencionado anteriormente. Los pentapéptidos cílicos RGD pueden caracterizarse por la fórmula c(RGDxX), donde el residuo x es un aminoácido aromático en la configuración D (esencial para la afinidad de unión de $\alpha\beta 3$ -integrina), tal como por ejemplo las secuencias c(RGDfV), c(RGDfK), c(RGDyK) o c(RGDfC).

Los péptidos que incluyen cualquiera de las secuencias descritas anteriormente exhiben, en algunas modalidades, actividad de penetración en células o tejidos, y particularmente en el tejido tumoral. Un conjunto de realizaciones se dirige generalmente a la asociación de péptidos que penetran en las células sin propiedades de direccionamiento, por ejemplo, para proporcionar al menos algunas de las nanoentidades con actividad de penetración en las células o tejidos cuando se administran de forma no sistémica a un sujeto (por ejemplo, intratumoral, nasal, tópico, intraperitoneal, vaginal, rectal, oral, pulmonar, ocular, etcétera), o cuando se administra *in vitro* o *ex vivo*, por ejemplo, a células o tejidos vivos. En algunos casos, parte del polímero de nanocápsulas (por ejemplo, PSA, HA, PGA) se une a péptidos que penetran en las células, por ejemplo, mediante asociación covalente o no covalente.

Pueden encontrarse algunos péptidos que penetran en las células, por ejemplo, en Zhang y otros, 2016, y Regberg y otros, 2012.

Los péptidos que penetran en células útiles para determinadas realizaciones de la presente invención se seleccionan, aunque no se limitan a, TAT, mTAT (C-5H-TAT-5H-C), G3R6TAT, TAT(49-57), TAT(48-60), MPS, VP22, Antp, gH625, CPP ricos en arginina (por ejemplo, octarginina, poliarginina, estearil-poliarginina, HIV-1 Rev34-50, FHV coat35-49) penetratina, penetratina-Arg, penetratina-Lys, SR9, HR9, PR9, H(7)K(R(2)), Pep-1, Pep-3, transportan, transportan10, pepFect, pVEC, JB577, TD-1, MPG8, CADY, YTA2, YTA4, SynB1, SynB3, PTD-4, GALA, SPACE, o similares.

Los péptidos que penetran en las células también pueden acoplarse con porciones de direccionamiento. Algunos ejemplos no limitantes son PEGA (CPGPEGAGC) (SEQ ID NO: 18), CREKA (SEQ ID NO: 19), RVG (YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNG) (SEQ ID NO: 20), DV3 (LGASWHRPDKG) (SEQ ID NO: 21), DEVDG (SEQ ID NO: 22), ACPP-MMP-2/9 (PLGLAG) (SEQ ID NO: 23), ACPP-MMP-2 (IAGEDGDEFG) (SEQ ID NO: 24), R8-GRGD (SEQ ID NO: 25), penetratina-RGD o similares.

Las porciones de direccionamiento útiles para determinadas realizaciones de la presente invención se seleccionan a partir de, aunque no se limitan a, péptidos, como por ejemplo, péptidos CendR (por ejemplo, Lyp1, cLyp1, tLyp1, iRGD, iNGR, TT1, TT1 lineal, RPAPAR, F3, etcétera), péptidos RGD, péptidos NGR; proteínas (por ejemplo, transferrina, proteína de repetición de anquirina, insulina); moléculas pequeñas (por ejemplo, ácido fólico, trifenilfosfonio, ACUPA, PSMA); porciones de carbohidratos (por ejemplo, manosa, glucosa, galactosa y sus derivados); anticuerpos (que incluyen nanocuerpos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos monoclonales, afficuerpos u otros anticuerpos) y aptámeros.

En una modalidad, la composición comprende una porción de direcciónamiento. En otra modalidad, la porción de direcciónamiento comprende un péptido que penetra en las células y/o un péptido que penetra en el tumor/tejido. En una realización adicional, la porción de direcciónamiento se selecciona del grupo que consiste en Lyp-1, tLyp-1, y cLyp-1. En otra modalidad, el polímero es PSA o HA y la porción de direcciónamiento es tLyp-1.

60 Enlace entre el polímero y la porción de direcciónamiento

En determinadas modalidades, algunos de los polímeros (por ejemplo, PSA, HA, PGA) están unidos a una porción de direccionamiento, por ejemplo, de forma covalente. El polímero se une a una porción de direccionamiento directa o indirectamente, por ejemplo, a través de un enlazador, tal como un enlazador aminoalquil (C₁-C₄) succinimida (que incluye C₁, C₂, C₃ y C₄), o enlazador de isopropil aminoalquilo (que incluye C₁, C₂, C₃ y C₄). En algunos casos, se usan otros enlazadores de aminoalquilsuccinimida o aminoalquamilodoisopropilo. En algunas modalidades, la porción de direccionamiento comprende un extremo C, por ejemplo, para la unión. En algunos casos, el enlazador aminoalquilo (C₁-C₄) succinimida es un enlazador aminoetilsuccinimida, una aminopropilsuccinimida, una aminobutilsuccinimida o similares. El enlazador aminoalquilo (C₁-C₄) succinimida puede crearse, por ejemplo, mediante el uso de una reacción de acoplamiento de EDC/NHS (1-etyl-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidrocloruro/N-hidroxisuccinimida) para unir una porción maleimida a una porción de ácido carboxílico en una unidad de monómero (por ejemplo, una unidad de ácido siálico). En algunos casos, una porción N-aminoalquil (C₁-C₄) maleimida, tal como una porción N-aminoethyl maleimida se hace reaccionar con una porción de ácido carboxílico en una unidad de monómero para producir un enlace amida, de este modo se une la porción maleimida al polímero (por ejemplo, PSA). El enlazador aminoalquil (C₁-C₄) amido-iso-propil puede crearse, por ejemplo, mediante el uso de aminoethylmetacrilamida o N-(3-aminopropil)metacrilamida en presencia de BOP/TBA (benzotriazol-1-iloxy-tris(dimethylamino) hexafluorofosfato de fosfonio/hidróxido de tetra-n-butilamonio). La porción de maleimida o la porción de metacrililo pueden reaccionar después, por ejemplo, mediante la adición de tipo Michael, con una cisteína, un grupo tiol u otra porción que contenga azufre dentro del péptido para unir el péptido al polímero (por ejemplo, PSA, HA, PGA) mediante un aminoalquil (C₁-C₄) succinimida, tal como un enlazador de aminoetilsuccinimida, o mediante un enlazador aminoalquil (C₁-C₄) amidoisopropilo.

En algunas modalidades, el polímero (por ejemplo, PSA, HA, PGA) se une a una porción de direccionamiento directamente a través de un grupo amida. El grupo amida puede crearse, por ejemplo, haciendo reaccionar una porción de ácido carboxílico en una unidad de monómero (por ejemplo, una unidad de ácido siálico) y una lisina, arginina u otra porción que contiene amina primaria dentro del péptido, en particular el grupo de amina primaria es en un aminoácido lisina o arginina en la porción de direccionamiento. En algunas modalidades, un activador está presente en la reacción para formar un intermedio, como por ejemplo, una carbodiimida, N-hidroxisuccinimida o DMTMM (cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio).

Por lo tanto, un conjunto de realizaciones se dirige generalmente a un método para hacer reaccionar una porción carboxilato en un polímero (por ejemplo, PSA, HA, PGA) con una aminoalquil (C₁-C₄) maleimida y/o un aminoalquil (C₁-C₄) metacrilamida, y haciendo reaccionar el aminoalquil (C₁-C₄) maleimida y/o el aminoalquil (C₁-C₄) metacrilamida resultantes con un grupo cisteína en un péptido para producir el polímero-aminoalquil (C₁-C₄) succinimida-péptido y/o una composición de polímero-aminoalquil (C₁-C₄) amidoisopropil-péptido.

Otro conjunto de realizaciones está dirigido a un método para hacer reaccionar una porción carboxilato en un polímero (por ejemplo, PSA, HA, PGA) con una N-hidroxisuccinimida o una carbodiimida, y hacer reaccionar el intermedio formado con un grupo lisina o arginina en un péptido para producir un polímero-amida-péptido.

En una modalidad, la porción de direccionamiento se une al polímero de forma electrostática. En otra modalidad, la porción de direccionamiento se une al polímero mediante un enlazador. En una realización particular, el polímero es PSA o HA y la porción de direccionamiento es tLyp-1.

Polímero unido a una porción hidrófoba

La capa externa que comprende, por ejemplo, PSA o HA, puede unirse a una porción hidrófoba de forma covalente, electrostática o por otros medios. La porción hidrófoba puede comprender un grupo alquilo, por ejemplo, un grupo alquilo de cadena lineal. En algunos casos, la porción hidrófoba comprende al menos 2 átomos de carbono. En otros casos, la porción hidrófoba comprende al menos 3 átomos de carbono. En algunas modalidades, la porción hidrófoba comprende un grupo alquilo de cadena lineal C₂-C₂₄ (por ejemplo, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₂₂, C₂₃, y/o C₂₄). En una realización particular, la porción hidrófoba comprende un grupo alquilo de cadena lineal C₁₂. En algunos casos, la composición de la invención comprende, además, una cadena de carbono alifático unida covalentemente al polímero (por ejemplo, PSA). En otros casos, la cadena de carbono alifático comprende una cadena de carbono alifático C₂-C₂₄ (por ejemplo, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₂₂, C₂₃, y/o C₂₄).

Otros ejemplos de porciones hidrófobas incluyen C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₂₂, C₂₃, C₂₄, u otro grupo alquilo (por ejemplo, un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada, por ejemplo, un grupo isoalquilo). En algunos casos, la porción hidrófoba comprende al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23 o al menos 24 átomos de carbono. Las porciones hidrófobas están saturadas o insaturadas, por ejemplo, contienen uno o más dobles o triples enlaces carbono-carbono. Algunas técnicas para unir porciones hidrófobas se

describen en el documento WO2019086627A1. En algunos casos, las porciones hidrófobas se unen mediante el uso de la activación por una sal de amonio cuaternario (por ejemplo, hidróxido de tetrabutilamonio) y un tetrafluoroborato (por ejemplo, tetrafluoroborato de 2-bromo-1-etyl piridinio), antes de la reacción con una porción hidrófoba (por ejemplo, una alquil amina, tal como dodecilamina para C₁₂).

5 En una modalidad, al menos algunos de los polímeros están unidos a una porción hidrófoba. En otra modalidad, la porción hidrófoba se selecciona del grupo que consiste en un grupo alquilo, cicloalcanos, sales biliares y derivados, terpenoides, terpenos, porciones derivadas de terpenos y vitaminas lipófilas. En una realización adicional, la porción hidrófoba comprende un grupo alquilo de cadena lineal C₂-C₂₄. Aun en una realización adicional, la porción hidrófoba comprende un grupo alquilo de cadena lineal C₁₆.

10 Aun en una realización adicional, el polímero es HA y está unido a una porción hidrófoba. En particular, la porción hidrófoba comprende un grupo alquilo de cadena lineal C₁₆. Las nanoentidades pueden comprender opcionalmente una porción de direccionamiento tLyp-1.

15 Tensioactivos

20 Las nanoentidades pueden comprender uno o más tensioactivos. Ejemplos de tensioactivos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: monooleato de polioxietilensorbitán (polisorbato 80; Tween 80®; HLB 15), monoestearato de polioxietilensorbitán (Tween® 60, HLB 14.9 y Tween 61®; HLB 9.6), monooleato de polioxietilensorbitan (Tween 81®; HLB 10), triestearato de polioxietilensorbitan (Tween 65®; HLB 10.5), trioleato de polioxietilensorbitan (Tween 85®; HLB 11), monolaurato de polioxietilensorbitan (Tween® 20, HLB 16.7 y Tween 21®; HLB 13.3), monopalmitato de polioxietilensorbitan (Tween® 40, HLB 15.6); ésteres de ácidos grasos pegilados y mezclas con PEG, monoestearato de polietilenglicol (HLB 11.6), estearato de polietilenglicol, estearato de polietilenglicol 40 (HLB 17), estearato de polietilenglicol 100 (HLB 18.8), dilaurato de polietilenglicol 400 (HLB 9.7), dilaurato de polietilenglicol 400 (HLB 9.7) dilaurato 200 (HLB 5.9), monopalmitato de polietilenglicol (HLB 11.6), hidroxiestearato 15 de Macrogol (Kolliphor HS15®, BASF), hidroxiestearato 15 de polietilenglicol (HLB 14-16), succinato de polietilenglicol de D-alfa-tocoferilo (TPGS; HLB 13.2), oleato de trietanolamonio (HLB 12), oleato de sodio (HLB 18), colato de sodio (HLB 18), desoxicolato de sodio (HLB 16), lauril sulfato de sodio (HLB 40), glicocolato de sodio (HLB 16-18), oleato de trietanolamina (HLB 12), goma de tragacanto (HLB 11.9) y dodecilsulfato de sodio (HLB 40); Poloxámero 124 (HLB 16), Poloxámero 188 (HLB 29), Poloxámero 237 (HLB 29), Poloxámero 238 (HLB 28), Poloxámero 278 (HLB 28), Poloxámero 338 (HLB 27) y Poloxámero 407 (HLB 22), monooleato de sorbitán (Span® 80, HLB 4.3), monolaurato de sorbitán (Span® 20, HLB 8.6), monoestearato de sorbitán (Span® 60, HLB 4.7), trioleato de sorbitán (Span® 85, HLB 1.8), sesquiolato de sorbitán (Span® 83, HLB 3.7), monopalmitato de sorbitán (Span® 40, HLB 6.7), 35 isoestearato de sorbitán (Span® 120, HLB 4.7), macrogolglicéridos de lauroilo (por ejemplo, Gelucire® 44/14, HLB 14 y Labrafil® M2130CS, HLB 4), Macrogolglicéridos de estearoilo (por ejemplo, Gelucire® 50/13, HLB 13), macrogolglicéridos de linoleoilo (por ejemplo, Labrafil® M2125CS, HLB 4), macrogolglicéridos de oleoilo (Labrafil® M1944CS, HLB 4), macrogolglicéridos de caprilocaproilo (Labrasol®, HLB 14), lecitinas (por ejemplo, lecitina de 40 huevo, lecitina de soja, lecitina no-GMO, lecitina de colza, lecitina de girasol, lisolectina, etcétera), fosfolípidos (por ejemplo, fosfolípidos de huevo, fosfolípidos de soja, fosfolípidos sintéticos, fosfolípidos hidrogenados, fosfolípidos PEGilados, esfingolípidos, fosfatidicolina, lisofosfatidicolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, etcétera), Phosal®, Phospholipon®, o cualquier combinación de estos y/u otros tensioactivos. En algunos casos, el tensioactivo es catiónico, por ejemplo, cloruro de bencetonio, cloruro de benzalconio, CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio), cetrimida, bromuro de tetradeciltrimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio o similares. En algunos casos, el tensioactivo catiónico contiene una sal de amonio, por ejemplo, como un grupo de cabeza. Por ejemplo, el grupo de cabeza comprende una sal de amonio primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria. Además, debe entenderse que tales tensioactivos no son necesarios en todas las modalidades.

50 En algunas modalidades, el tensioactivo se encuentra principalmente en la interfase del núcleo interno y la capa externa.

55 En una realización particular, el tensioactivo es monooleato de polioxietilensorbitán (por ejemplo, Tween 80®). En una realización particular, las nanoentidades contienen monooleato de polioxietilensorbitán (por ejemplo, Tween 80®) e hidroxiestearato de macrogol 15 (Kolliphor HS15®) como tensioactivos.

Métodos para producir composiciones de nanocápsulas

60 Varios aspectos de la invención también se dirigen generalmente a sistemas y métodos para producir composiciones tales como las descritas en la presente descripción, por ejemplo, nanocápsulas u otras nanoentidades.

Las nanocápsulas poliméricas, tales como, por ejemplo, nanocápsulas basadas en PSA, nanocápsulas basadas en HA, nanocápsulas basadas en PGA, pueden producirse mediante una variedad de técnicas. Una de ellas es una técnica de desplazamiento de disolvente, que implica la mezcla de un disolvente polar en una fase acuosa. Otra

técnica es una técnica de autoemulsificación, que no requiere el uso de disolventes orgánicos. En algunos casos, esto incluye preparar una solución acuosa que comprende un polímero (por ejemplo, PSA, HA, PGA, PGA-PEG, PASP, PASP-PEG, PLMA, PLA-PEG, etcétera) y opcionalmente uno o más tensioactivos solubles en agua, preparar una solución oleosa (por ejemplo, que comprende un aceite y uno o más tensioactivos y un disolvente orgánico, etcétera) y mezclar las soluciones entre sí. Se cree que las nanocápsulas se forman debido a la interacción del polímero, por ejemplo, PSA, HA, PGA, PASP con un tensioactivo cargado positivamente en la interfase de la emulsión de aceite en agua. Sin embargo, la presencia de un tensioactivo catiónico puede no ser necesaria cuando se usan polímeros modificados hidrofóbicamente, ya que la presencia de cadenas de alquilo/componentes hidrofobos promueve la unión del polímero mediante su inserción en la nanogota oleosa.

Los agentes farmacéuticos pueden disolverse en la fase acuosa o en la fase oleosa antes de preparar las nanoentidades o incubarse con las nanoentidades preformadas. Cuando el agente farmacéutico es un anticuerpo tal como un anticuerpo monoclonal, el anticuerpo se encapsula particularmente disolviéndolo en la fase acuosa o en la fase oleosa (si está muy concentrada) antes de preparar las nanocápsulas.

Como ejemplo, en una modalidad, esto incluye preparar una fase acuosa que comprende un polímero (por ejemplo, PSA o HA); preparar una fase hidrófoba que comprende un compuesto hidrófobo (por ejemplo, que comprende un aceite y uno o más tensioactivos, y opcionalmente un disolvente orgánico, etcétera); añadir un anticuerpo o un fragmento de este, que se une a un epítopo intracelular de una proteína KRAS mutada activada, a la fase acuosa u, opcionalmente, a la fase hidrófoba si el anticuerpo o el fragmento está muy concentrado; y mezclar la fase acuosa y la fase hidrófoba con agitación. Este método puede denominarse en la presente descripción "método de una sola etapa". En una realización particular, el compuesto hidrófobo es un aceite y la fase hidrófoba también comprende un tensioactivo. En otra modalidad, la fase acuosa comprende, además, un tensioactivo. En otra modalidad, el polímero está unido a una porción hidrófoba.

En otro caso, el método incluye preparar una solución oleosa (por ejemplo, que comprende un aceite y uno o más tensioactivos y opcionalmente un solvente orgánico, etcétera) y agregarlo a una fase acuosa (o agregar la fase acuosa sobre la fase oleosa). La fase acuosa comprende un polímero (por ejemplo, PSA o HA) y opcionalmente contiene uno o más tensioactivos solubles en agua. Las soluciones se mezclan con agitación para formar nanocápsulas. Una vez que se forman las nanocápsulas, se agrega una fase acuosa adicional que comprende un anticuerpo o un fragmento de este, con agitación para producir las nanocápsulas cargadas con anticuerpo mediante incubación. Este método puede denominarse en la presente descripción "método de dos etapas".

Si se añade un solvente orgánico, en algunos casos se evapora total o parcialmente.

El polímero también puede funcionalizarse con una porción de direccionamiento tal como un péptido que penetra en las células y/o un péptido que penetra en el tumor/tejido o con una porción hidrófoba tal como un grupo alquilo de cadena lineal.

Como ejemplo, el PSA puede unirse a tLyp-1 mediante unión covalente entre los grupos tiol del péptido tLyp-1 y los grupos carboxilato del PSA. Este enfoque sintético usó el enlazador heterobifuncional aminoetil maleimida que permite, primero, su incorporación a través del grupo amina del enlazador a los grupos carboxilatos de PSA (mediante el uso de la química de carbodiimida) y segundo, la unión de péptidos mediante la adición del grupo tiol del péptido (residuo de cisteína) al grupo maleimida del enlazador (adición de tipo Michael), siguiendo un proceso de 2 etapas. Esta estrategia permitió la conservación de los grupos biológicamente activos del péptido tLyp-1. Además, el grado de sustitución puede controlarse fácilmente.

Típicamente, los polipéptidos purificados tales como los anticuerpos, son solo marginalmente estables en un estado acuoso y sufren una degradación química y física que resulta en una pérdida de la actividad biológica durante el procesamiento y almacenamiento. Adicionalmente, las composiciones de péptidos en fase acuosa se someten a hidrólisis, tal como desamidación y escisión de enlaces peptídicos. Estos efectos representan un problema grave para los anticuerpos terapéuticamente activos que están destinados a ser administrados a seres humanos dentro de un intervalo de dosificación definido basado en la actividad biológica. Por esa razón, se evaluó si las nanoentidades producidas podían mantener la funcionalidad después de la liofilización.

Por lo tanto, realización la presente descripción se refiere a un método para producir nanoentidades, que comprende una etapa adicional de liofilización, que puede conservarlas durante el almacenamiento. En algunos casos, no es necesario usar crioprotectores durante la liofilización. En algunos casos, no es necesario diluir el sistema coloidal antes de la liofilización, ya que las nanoentidades no forman agregados durante la reconstitución del liofilizado. En algunos casos, es posible agregar uno o más azúcares, por ejemplo, azúcares que ejercen un efecto crioprotector. Los ejemplos de crioprotectores incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: trehalosa, glucosa, sacarosa, manitol, maltosa, polivinilpirrolidona (PVP), glicerol, polietilenglicol (PEG), propilenglicol, 2-metil-2,4-pantanodiol (MPD), rafinosa, dextrano, fructosa, estaquiosa o similares. En algunos casos, los crioprotectores u otros aditivos tienen

otros efectos, por ejemplo, como tampones para controlar el pH. En la forma liofilizada, las nanoentidades se almacenan durante largos períodos de tiempo y pueden regenerarse, por ejemplo, mediante la adición de agua.

Combinación del anticuerpo o fragmento de este con otros agentes farmacéuticos/fármacos

- 5 En una realización particular, el anticuerpo, o el fragmento de este, está en combinación con otros agentes farmacéuticos/fármacos. Pueden ubicarse internamente y/o en la superficie de las nanoentidades, en dependencia de la modalidad.
- 10 El agente farmacéutico puede tener actividad farmacológica y/o potenciar el efecto del anticuerpo o el fragmento de este y/o puede tener otro efecto directo en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de la enfermedad.
- 15 Dados los mayores requisitos metabólicos de las células tumorales, no es sorprendente que determinados tipos de tumores hayan desarrollado mecanismos para secuestrar nutrientes tanto de fuentes extracelulares como intracelulares. En particular, los cánceres conducidos por RAS tienen numerosas adaptaciones metabólicas diferentes que les permiten reciclar varios metabolitos. Esto tiene dos propósitos clave; 1) proporciona flexibilidad y eficiencia metabólicas; y 2) asegura la disponibilidad adecuada de precursores biosintéticos. Es importante destacar que estas vías de eliminación se han vuelto críticas para el metabolismo de estos cánceres y pueden proporcionar oportunidades terapéuticas. Por lo tanto, en realizaciones particulares, los anticuerpos anti-KRAS se combinan con, por ejemplo, inhibidores de macroautofagia tales como cloroquinas, inhibidores de transportadores de glucosa (GLUT), inhibidores de lactato deshidrogenasa e inhibidores glicolíticos.
- 20 KRAS es un nodo central en una red compleja que proporciona muchas oportunidades para circuitos de retroalimentación que permiten que el cáncer prolifere y sobreviva. Por lo tanto, en realizaciones particulares, los anticuerpos anti-KRAS se combinan con otras terapias dirigidas, tales como las dirigidas a IGFR, mTOR, RAF, MEK, PIK3, EGFR/ERBB2, SHP2 o inhibidores de puntos de control inmunitarios para potencialmente ejercer un efecto sinérgico en términos de regresión tumoral, contribuir a generar una inmunidad antitumoral o superar la resistencia en comparación con cada fármaco solo.
- 25 En una realización particular, el agente farmacéutico adicional es un fármaco contra el cáncer, tal como por ejemplo, paclitaxel o docetaxel.
- 30 Los agentes farmacéuticos están presentes hasta aproximadamente el 50 % en peso con respecto al peso seco total de los componentes del sistema. Sin embargo, la proporción adecuada dependerá de una variedad de factores tales como los agentes farmacéuticos que se van a incorporar, la indicación para la que se usa, la eficacia de administración, etcétera. Por ejemplo, en algunos casos, los agentes farmacéuticos están presentes hasta aproximadamente el 10 % en peso, o hasta aproximadamente el 5 % en peso, o hasta aproximadamente el 2 % en peso, o hasta aproximadamente el 1 % en peso, o hasta aproximadamente el 0.5 % en peso, o hasta aproximadamente 0.1 % en peso. En determinadas modalidades, está presente más de un agente farmacéutico, que puede disolverse en la misma solución o por separado, en dependencia de la naturaleza del ingrediente farmacéutico activo a incorporar.

Composiciones farmacéuticas y formas de administración

- 45 También se describe un método para administrar a un organismo vivo una composición que comprende las nanoentidades, y particularmente las nanocápsulas discutidas en la presente descripción. Cuando se administran, las composiciones de la invención se aplican en una cantidad con eficacia terapéutica como una formulación aceptable farmacéuticamente. Como se usa en la presente descripción, el término "aceptable farmacéuticamente" significa que la formulación contiene agentes o excipientes compatibles con la forma requerida para la administración a un organismo vivo, sin causar efectos deletéreos. Cualquiera de las composiciones de la presente invención se administra al organismo vivo en una dosis con eficacia terapéutica. Una "eficacia terapéutica" o "eficaz" como se usa en la presente descripción significa la cantidad necesaria para retrasar el inicio, inhibir la progresión, detener por completo el inicio o progresión, diagnosticar una afección particular que se está tratando o lograr de cualquier otro modo un resultado médica conveniente. Cuando se administra a un organismo vivo, las cantidades eficaces dependerán de la afección particular que se esté tratando y del resultado conveniente. Los expertos en la técnica determinan una dosis con eficacia terapéutica. Algunas realizaciones de la invención se dirigen generalmente al uso de una composición como se describe en la presente descripción para la preparación de un medicamento.
- 60 Se usa cualquier método médica acceptable para administrar la composición al organismo vivo. La administración es localizada (es decir, en una región, sistema fisiológico, tejido, órgano o tipo celular particular) o sistémica, en dependencia de la afección a tratar. Por ejemplo, la composición se administra por vía oral, o mediante

- 5 otras técnicas tales como por vía vaginal, rectal, bucal, pulmonar, tópica, nasal, transdérmica, intratumoral, intraperitoneal, mediante inyección o implantación parenteral, mediante administración quirúrgica, o cualquier otro método de administración donde la composición de la invención logra el acceso a la diana. Las composiciones adecuadas para la administración oral se presentan como unidades discretas tales como cápsulas duras o blandas, píldoras, sobres, comprimidos, grageas o pastillas, cada una de las cuales contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo. Otras composiciones orales adecuadas para usar con la invención incluyen soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos tales como un jarabe, un elixir o una emulsión. En otro conjunto de modalidades, la composición se usa para fortalecer un alimento o una bebida. La administración rectal puede usarse en algunas modalidades, por ejemplo, en forma de enema, supositorio o espuma.
- 10 10 En un conjunto de modalidades, la administración de la composición es parenteral, intratumoral u oral. En algunas modalidades, la composición se administra mediante inyección o infusión. En una modalidad, la inyección se selecciona entre inyección intratumoral, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular o intravenosa. En otra modalidad, la composición se administra mediante inyección o infusión intratecal.
- 15 15 En determinadas realizaciones de la invención, la administración de una composición de la invención está diseñada para dar como resultado exposiciones secuenciales a una composición durante un determinado período de tiempo, por ejemplo, horas, días, semanas, meses o años. Esto se logra, por ejemplo, mediante administraciones repetidas de una composición de la invención por uno de los métodos descritos anteriormente. La administración de una composición puede ser sola o en combinación con otros agentes terapéuticos y/o composiciones.
- 20 20 En una realización particular, la administración de la composición es por vía intravenosa, intratumoral, intraperitoneal, subcutánea o por inhalación. Particularmente, la administración es intravenosa.
- 25 25 En determinadas realizaciones de la invención, una composición puede combinarse con un portador adecuado aceptable farmacéuticamente, por ejemplo, incorporado en un sistema de liberación de polímero, o suspendido en un líquido, por ejemplo, en forma disuelta o en una forma coloidal. En general, los portadores adecuados aceptables farmacéuticamente para usar en la invención son bien conocidos por los expertos en la técnica. Como se usa en la presente descripción, un "portador aceptable farmacéuticamente" se refiere a un material no tóxico que no interfiere significativamente con la efectividad de la actividad biológica de los compuestos activos que se van a administrar, pero que se usa como ingrediente de formulación, por ejemplo, para estabilizar o proteger los compuestos activos dentro de la composición antes de usar. El término "portador" indica un ingrediente orgánico o inorgánico, que es natural o sintético, con el que se combinan uno o más compuestos activos de la invención para facilitar la aplicación de una composición como se describe en la presente descripción. El portador se entremezcla o se mezcla de cualquier otra manera con una o más composiciones de la presente invención, y entre sí, de manera tal que no haya interacción que pudiera perjudicar sustancialmente la eficacia farmacéutica conveniente. El portador es soluble o insoluble, en dependencia de la aplicación. Los ejemplos de portadores bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasa, celulosa natural y modificada, poliacrilamida, agarosa y magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble o insoluble. Los expertos en la técnica conocerán otros portadores adecuados, o serán capaces de determinarlos, mediante el uso únicamente de la experimentación de rutina.
- 30 30 En algunas modalidades, una composición de la invención puede incluir portadores aceptables farmacéuticamente con ingredientes de la formulación tales como sales, portadores, agentes tamponantes, emulsionantes, diluyentes, excipientes, agentes quelantes, rellenos, agentes secantes, antioxidantes, antimicrobianos, conservantes, agentes aglutinantes, agentes espesantes, sílicas, solubilizantes o estabilizadores que se usan con el compuesto activo. Por ejemplo, si la formulación es un líquido, el portador puede ser un disolvente, disolvente parcial o no disolvente, y puede ser de base acuosa u orgánica. Los ejemplos de ingredientes de formulación adecuados incluyen diluyentes tales como carbonato cálcico, carbonato sódico, lactosa, caolín, fosfato cálcico o fosfato sódico; agentes de granulación y desintegración tales como almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes tales como almidón, gelatina o goma arábiga; agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco; materiales de retardo temporal tales como monoestearato de glicerol o diestearato de glicerol; agentes de suspensión tales como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmelcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona; agentes dispersantes o humectantes tales como lecitina u otros fosfátidos de origen natural; agentes espesantes tales como alcohol cetílico o cera de abejas; agentes tamponadores tales como ácido acético y sales de este, ácido cítrico y sales de este, ácido bórico y sales de este, o ácido fosfórico y sales de este; o conservantes tales como cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabenos o timerosal. Los expertos en la técnica pueden determinar las concentraciones de portadores adecuadas, mediante el uso únicamente de la experimentación de rutina. Una composición como se describe en la presente descripción puede formularse en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas tales como tabletas, cápsulas, elixires, polvos, gránulos, ungüentos, soluciones, depósitos, inhalantes o inyectables. Los expertos en la técnica conocerán otros ingredientes de formulación adecuados, o serán capaces de determinarlos, mediante el uso únicamente de la experimentación de rutina.
- 35 35
- 40 40
- 45 45
- 50 50
- 55 55
- 60 60

Las preparaciones incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles, que pueden ser isotónicas con la sangre del organismo vivo en determinadas modalidades. Los ejemplos de disolventes no acuosos son polipropilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de coco, aceite de cacahuete, aceite mineral, ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo o aceites fijos que incluyen mono o diglicéridos sintéticos. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, que incluye medios salinos y tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, 1,3-butanodiol, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (como los basados en la dextrosa de Ringer) y similares. También están presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente los diversos parámetros para preparar y formular una composición como se describe en la presente descripción sin recurrir a una experimentación indebida.

La presente descripción también proporciona cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente en kits, que incluyen opcionalmente instrucciones de uso de la composición para, por ejemplo, el tratamiento del cáncer. También pueden proporcionarse instrucciones para administrar una composición mediante cualquier técnica adecuada como se describió anteriormente, por ejemplo, por vía oral o intravenosa. El kit define típicamente un paquete que incluye una cualquiera o una combinación de composiciones de la invención y otros ingredientes como se describió previamente. Los kits también pueden incluir otros recipientes con uno o más disolventes, tensioactivos, conservantes y/o diluyentes (por ejemplo, solución salina normal (0.9 % NaCl) o dextrosa al 5 %) así como también recipientes para mezclar, diluir o administrar la composición a un organismo vivo. Las composiciones del kit pueden proporcionarse como soluciones líquidas o como polvos secos. Cuando una composición proporcionada es un polvo seco, la composición puede reconstituirse mediante la adición de un disolvente adecuado. En realizaciones donde se usan formas líquidas de una composición, la forma líquida puede estar concentrada o lista para usar. El disolvente dependerá de la composición y el modo de uso o administración.

Aplicaciones médicas

Un aspecto de la invención se refiere a la composición de nanoentidades para usar en medicina (es decir, como un medicamento). Un aspecto de la invención se refiere a la composición que comprende las nanoentidades para usar en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada a una mutación en un gen KRAS. Alternativamente, la descripción se refiere al uso de una composición de la invención para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada con una mutación en un gen KRAS. Alternativamente, la descripción se refiere a un método para prevenir y/o tratar una enfermedad asociada con una mutación en un gen KRAS que comprende administrar una composición de la invención a un sujeto que lo necesite.

Como se usa en la presente descripción, los términos "tratar", "tratamiento" o "tratamiento de" se refieren a reducir el potencial de una determinada enfermedad o trastorno, reducir la aparición de una determinada enfermedad o trastorno y/o una reducción en la gravedad de una determinada enfermedad o trastorno, particularmente, hasta el punto de que el sujeto ya no sufre molestias y/o función alterada debido a ello. Por ejemplo, "tratar" puede referirse a la capacidad de una terapia cuando se administra a un sujeto, para evitar que se produzca una determinada enfermedad o trastorno y/o curar o aliviar determinados síntomas, signos o causas de una enfermedad. "Tratar" también se refiere a mitigar o disminuir al menos un síntoma clínico y/o a la inhibición o el retraso en la progresión de la afección y/o prevención o retraso del inicio de una enfermedad o dolencia. Por lo tanto, los términos "tratar", "tratamiento" o "tratamiento de" (o términos gramaticalmente equivalentes) se refieren a regímenes de tratamiento tanto profilácticos como terapéuticos. En particular, "tratamiento", como se usa en la presente descripción, se refiere a la administración de una composición de acuerdo con la invención a un sujeto que padece una enfermedad asociada a una mutación en un gen KRAS, que incluye la administración en una etapa inicial o temprana de una enfermedad, donde el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no conveniente. La presente descripción proporciona usos y composiciones que generalmente proporcionan un beneficio terapéutico o los resultados clínicos deseados. Un beneficio terapéutico no es necesariamente una cura para una enfermedad o trastorno en particular, sino que más bien abarca un resultado que típicamente incluye el alivio de la enfermedad o trastorno o el aumento de la supervivencia, eliminación de la enfermedad o trastorno, reducción o alivio de un síntoma asociado con la enfermedad o el trastorno, prevención o alivio de una enfermedad, trastorno o afección secundaria resultante de la aparición de una enfermedad o trastorno primario, disminución de la extensión de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o mitigación del estado de enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable y/o prevención de la enfermedad o trastorno. El tratamiento también significa prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe el tratamiento.

El término "prevención", "que previene" o "prevenir", como se usa en la presente descripción, se refiere a la administración de una combinación de acuerdo con la invención o de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención a un sujeto que no ha sido diagnosticado como que posiblemente tenga una enfermedad asociada a

una mutación en un gen KRAS en el momento de la administración, pero que normalmente se esperaría que desarrolle dicha enfermedad o que tenga un mayor riesgo de padecer dicha enfermedad. La prevención pretende evitar la aparición de dicha enfermedad. La prevención puede ser completa (por ejemplo, la ausencia total de una enfermedad). La prevención también puede ser parcial, de manera que, por ejemplo, la aparición de una enfermedad en un sujeto es menor que la que habría ocurrido sin la administración de la composición de la presente invención. La prevención también se refiere a la susceptibilidad reducida a una afección clínica.

El término "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" incluye cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, para el que es conveniente el diagnóstico, el pronóstico o la terapia. Los sujetos mamíferos incluyen seres humanos, animales domésticos, animales de granja y animales de zoológico o mascotas tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas, etcétera. En una realización particular de la invención, el sujeto es un mamífero. En una realización más particular de la invención, el sujeto es un ser humano, particularmente un ser humano de cualquier raza y sexo. En algunas modalidades, un sujeto es un sujeto virgen de tratamiento. Un sujeto virgen de tratamiento es un sujeto al que no se le ha administrado una terapia. En otra modalidad, un sujeto ha recibido terapia y/o una o más dosis de un agente terapéutico para tratar la enfermedad asociada a una mutación en un gen KRAS.

Las mutaciones oncodiagnósticas de RAS contribuyen a la inducción de varios cánceres, que incluye los adenocarcinomas ductales pancreáticos (PDAC), los adenocarcinomas colorrectales (CRC), los adenocarcinomas de pulmón y los adenocarcinomas gástricos. Los genes RAS mutados, que representan la familia de oncogenes mutados con mayor frecuencia, están presentes en aproximadamente el 25 % de los tumores humanos. Las mutaciones dentro de KRAS representan el 85 % de todas las mutaciones oncodiagnósticas de la familia RAS.

En una realización particular, la enfermedad asociada a una mutación en el gen KRAS es el cáncer. En realizaciones más particulares, el cáncer es una neoplasia maligna hematológica tal como la leucemia. El término "neoplasia maligna hematológica" se refiere a un tipo de cáncer que afecta la sangre, la médula ósea y los ganglios linfáticos, e incluye linfomas, mielomas y leucemias. Los ejemplos de neoplasias hematológicas donde el gen KRAS está mutado son leucemia mielógena aguda (AML), leucemia mieloide aguda con factor de unión nuclear, leucemia mielomonocítica juvenil (JMML), mieloma múltiple, síndromes mielodisplásicos y síndrome linfoproliferativo autoinmunitario.

En otras realizaciones particulares, el cáncer es un tumor sólido. "Tumor sólido" o cánceres sólidos son neoplasias (nuevo crecimiento de células) o lesiones (daño de estructuras anatómicas o alteración de funciones fisiológicas) formadas por un crecimiento anormal de células de tejido corporal distintas de las células sanguíneas, de la médula ósea o linfáticas. Un tumor sólido consiste en una masa anormal de células que pueden provenir de diferentes tipos de tejidos, tales como el hígado, el colon, la mama o el pulmón, y que inicialmente crece en el órgano de su origen celular. Sin embargo, tales cánceres pueden diseminarse a otros órganos a través del crecimiento de tumores metastásicos en etapas avanzadas de la enfermedad. Los ejemplos de tumores sólidos son carcinomas, sarcomas, germinomas y blastomas.

En realizaciones particulares, el cáncer es un adenocarcinoma. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer gástrico (particularmente adenocarcinoma gástrico), colangiocarcinoma, cáncer de pulmón (particularmente adenocarcinomas de pulmón), cáncer colorrectal (particularmente adenocarcinoma colorrectal (CRC)), cáncer de páncreas (particularmente adenocarcinoma ductal (PDAC)), melanoma cutáneo de piel, carcinoma endometrioides del cuerpo uterino, carcinosarcoma uterino, carcinoma de tiroides, adenocarcinoma de estómago, carcinoma urotelial de vejiga, adenocarcinoma cervical, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, adenocarcinoma de esófago.

Las sustituciones de G12V y G12D KRAS se encuentran entre las mutaciones más comúnmente observadas en el adenocarcinoma de páncreas (30 % y 51 %, respectivamente) y adenocarcinomas colorrectales (27 % y 45 %, respectivamente) y se han asociado con un pronóstico precario. Por lo tanto, en realizaciones particulares, el cáncer es adenocarcinoma de páncreas y adenocarcinoma colorrectal.

En una realización particular, la enfermedad está asociada con una sustitución en G12 de un gen KRAS. Más particularmente, la enfermedad es carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinoma colorrectal, tumor sólido maligno, leucemia mieloide aguda, carcinoma de pulmón de células escamosas, adenocarcinoma colorrectal, adenocarcinoma ductal pancreático, adenocarcinoma de recto, carcinoma de pulmón de células pequeñas, glioma, adenocarcinoma de glándula tiroides, mieloma múltiple y síndromes mielodisplásicos.

En una realización particular, la sustitución es G12V y la enfermedad es adenocarcinoma colorrectal, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma ductal pancreático, neoplasia del cuerpo uterino y neoplasia de ovario, que tienen la mayor prevalencia.

En una realización particular, la sustitución es G12C y la enfermedad es carcinoma de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma colorrectal, adenocarcinoma del primario desconocido, neoplasia del cuerpo uterino y cáncer primario desconocido, los mencionados anteriormente tienen la mayor prevalencia.

- 5 En una realización particular, la sustitución es G12D y la enfermedad es adenocarcinoma colorrectal, adenocarcinoma ductal pancreático, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, neoplasia del cuerpo uterino y neoplasia de ovario que tiene la mayor prevalencia.
- 10 En otras modalidades, la enfermedad asociada a una mutación de KRAS es el síndrome de Noonan (NS), el síndrome cardiofaciocutáneo (CFC) y el nevo epidérmico. Las mutaciones de la línea germinal en el gen KRAS también causan un trastorno cuyas características principales se superponen con las del síndrome cardiofaciocutáneo y dos trastornos relacionados denominados síndrome de Noonan y síndrome de Costello. Esta afección se ha descrito como el fenotipo asociado a la mutación de KRAS.
- 15 La presente descripción está dirigida a nanoentidades para aplicaciones de suministro de fármacos. Por ejemplo, tales nanoentidades se suministran a un sujeto de manera que lleguen a un tumor que padece el sujeto. Las nanoentidades se suministran a las células tumorales, opcionalmente facilitadas por una porción de direccionamiento que también tiene capacidad como péptidos que penetran células o tumores/tejidos tales como Lyp-1 o tLyp-1, u otros péptidos discutidos en la presente descripción. Una vez suministradas, las nanoentidades 20 pueden acceder a las células diana, por ejemplo, células cancerosas y células cancerosas metastásicas, y liberar el fármaco contenido en ellas (es decir, el anticuerpo anti-KRAS). Por lo tanto, la presente descripción se refiere a un método para suministrar un anticuerpo anti-KRAS o un fragmento de este a células diana que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende las nanoentidades de acuerdo con la invención, donde las nanoentidades atraviesan las membranas celulares de las células diana. En particular, las células diana son células 25 cancerosas. De acuerdo con los ejemplos proporcionados en la presente descripción, las nanoentidades son capaces de penetrar en las células provocando el suministro intracelular del anticuerpo anti-KRAS o fragmento de este. Por lo tanto, la presente descripción se refiere a la composición de acuerdo con la invención para el suministro intracelular, en particular, para el suministro intracelular *in vivo*. Además, las nanoentidades con el anticuerpo o el fragmento de este pueden realizar su función biológica dentro de la célula, por ejemplo, la reducción de la 30 proliferación celular. Por lo tanto, la presente descripción también proporciona un método para reducir la proliferación celular en una célula tumoral, que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende las nanoentidades de acuerdo con la invención.
- 35 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica. En la práctica de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones tales como "que comprende" no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Los objetos, 40 ventajas y características adicionales de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de la descripción o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas descritas en la presente descripción. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan en la presente descripción con fines ilustrativos y sin pretender limitar la presente invención.

45 **EJEMPLOS**

EJEMPLO 1: Capacidad de los AcM anti-KRAS para interactuar específicamente con sus proteínas diana

- 50 Este ejemplo ilustra la capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-KRAS para interactuar específicamente con sus proteínas diana. Se realizaron dos estudios diferentes para investigar esta capacidad:
- 55 (i) Interacción de anticuerpos monoclonales anti-KRAS con los péptidos antigenéticos sintéticos usados para su generación anterior mediante la tecnología de hibridomas. Estos péptidos corresponden a la secuencia de aminoácidos (posiciones 5-16) de la proteína KRAS. Los péptidos se sintetizaron de acuerdo con las secuencias representadas en la Tabla 2 (Karebay Biochem, EE. UU.;> 95 % de pureza de acuerdo a CoA) y se conjugaron adicionalmente con una proteína transportadora, albúmina de suero bovino (BSA), por razones prácticas (Biogenes, Alemania). Los códigos internos asignados a los péptidos una vez conjugados con BSA también se muestran en la Tabla 2 más abajo.
- 60 (ii) Interacción de anticuerpos monoclonales anti-KRAS con diferentes proteínas KRAS mutadas humanas recombinantes.

(i) Interacción de anticuerpos monoclonales anti-KRAS con los péptidos antigenéticos sintéticos

Preparación del conjugado péptido-BSA para la evaluación por ELISA: se añadió un residuo de cisteína terminal al péptido durante su síntesis y el grupo sulfhidrilo se usó para conjugar el péptido con BSA mediante el siguiente método de dos etapas:

5 1. Maleilación de BSA: 1 mg del agente de reticulación SMCC (50 mg/ml, en N-metil-2-pirrolidona, NMP) se añadió a 1 ml de solución de BSA (10 mg/ml, en NaHCO₃ 0.1 mM pH 8,3). Despues de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente (TA), la solución se desaló mediante el uso de una columna Sephadex G-50 (1.5 x 14 cm) previamente equilibrada con PBS.

10 2. Conjugación de la BSA maleilada: se añadieron 50 µl de la solución de péptido (10 mg/ml, en agua bdestilada) a 1 ml de BSA maleilada (1.0 mg/ml, en PBS) y se incubaron a TA durante 2 horas a 4 °C seguido de otras 4 horas a TA. Los grupos maleimida que no habían reaccionado se bloquearon mediante la adición de 2-mercptoetanol hasta una concentración final de 10 mM y se incubaron durante la noche a 4 °C. Finalmente, el conjugado se dializó contra 15 3 x 500 volúmenes de PBS a 4 °C (umbral de peso molecular 10 000).

Tabla 2

Mutación KRAS	Secuencia del péptido	Código
G12V	KLVVVGAVGVGK (SEQ ID NO: 40)	820940-BSA
G12D	KLVVVGADGVGK (SEQ ID NO: 41)	820941-BSA
G12C	KLVVVGACGVGK (SEQ ID NO: 42)	820942-BSA

20 Las placas de ELISA se recubrieron con péptido antigénico 820940-BSA (G12V), péptido antigénico 820941-BSA (G12D) y péptido antigénico 820942-BSA (G12C) a 4 µg/ml (50 µl/pocillo) y se procesaron mediante el empleo de un ELISA indirecto mediado por una fosfatasa alcalina mediante el uso de una IgG anti-ratón generada en cabra específica del Fc como anticuerpo secundario. Los resultados representan la OD405 nm después de 15 minutos de incubación del sustrato.

25 Todos los anticuerpos anti-KRAS (clon DWP, clon D113 y clon D210) interactuaron con sus péptidos antigénicos correspondientes. Los resultados obtenidos para los clones D113 y D210 titulados con su correspondiente péptido antigénico 820941-BSA (G12D) se representan en la Tabla 3 más abajo.

30 Tabla 3:

Concentración de anticuerpos (ng/mL)	Clon D113	Clon D210
625	2.265	1.960
156	2.239	1.916
39	2.228	1.760
9.8	1.997	1.648
2.4	1.762	1.453
0.6	1.394	1.140
Blanco*	0.009	

*Tampón de bloqueo en lugar de anticuerpo para la preparación de muestras

35 (ii) Interacción de anticuerpos monoclonales anti-KRAS con diferentes proteínas KRAS mutadas humanas recombinantes.

A continuación, se recubrió una placa de ELISA con una proteína mutada KRAS (G12V) recombinante (SignalChem, Canadá, número de catálogo R06-32CH) a 2 µg/ml (50 µl/pocillo) y se procesó mediante el empleo de un ELISA indirecto mediado por fosfatasa alcalina mediante el uso de una IgG anti-ratón generada en cabra específica de Fc como anticuerpo secundario. Los resultados representan la OD405 nm después de 15 minutos de incubación del sustrato.

5 También se recubrió una placa de ELISA con una proteína mutada KRAS (G12D) recombinante (Sino Biological, número de catálogo 12259-H07E1) a 5 µg/ml (50 µl/pocillo) y se procesó mediante el empleo de un ELISA indirecto mediado por peroxidasa de rábano picante mediante el uso de una anti-IgG de ratón generada en cabra (H+L), conjugada a HRP como anticuerpo secundario. Los resultados representan la OD405 nm después de 25 minutos de incubación del sustrato.

10 Todos los anticuerpos anti-KRAS (clon DWP, clon D113 y clon D210) interactuaron con sus correspondientes proteínas diana mutadas.

15 Adicionalmente, se evaluó la especificidad de los anticuerpos anti-KRAS (subclones DWP, D113 y D210) mediante el uso de diferentes péptidos antigenicos correspondientes a mutaciones G12V, G12D y G12C KRAS (4 µg/ml) y también con la proteína recombinante G12V KRAS (5 µg/ml).

15 Como se muestra en la Tabla 4 más abajo, cada clon solo pudo interactuar con su correspondiente péptido y/o proteína diana.

Tabla 4:

Clon	Péptido 820940-BSA (G12V)	Péptido 820941-BSA (G12D)	Péptido 820942-BSA (G12C)	Proteína KRAS G12V recombinante
DWP (G12V)	0.841	0.046	0.054	2.769
D113 (G12D)	0.006	2.391	0.005	0.053
D210 (G12D)	0.007	2.099	0.007	0.020

20 Conclusiones:

25 Los anticuerpos anti-KRAS (clon DWP, D113 y D210) fueron capaces de interactuar selectivamente con los péptidos antigenicos correspondientes (usados para su generación mediante la tecnología de hibridomas) y también con las proteínas diana KRAS humanas recombinantes correspondientes. Por lo tanto, DWP solo interactuó con el péptido 820940-BSA (G12V) y con la proteína KRAS G12V recombinante; mientras que D113 y D210 solo interactuaron con el péptido 820941-BSA (G12D) y con la proteína KRAS G12D recombinante.

30 EJEMPLO 2: Determinación del valor KD de dos AcM anti-KRAS (D210 y D113) para su antígeno soluble (proteína KRAS G12D)

35 Este ejemplo ilustra la determinación del valor KD de dos anticuerpos monoclonales anti-KRAS (D210 y D113) para su antígeno soluble (proteína KRAS G12D) mediante la tecnología Resonancia de Plasmones de Superficie (SPR) (GE Biacore 8K).

40 La KD es la constante de disociación de equilibrio, que está inversamente relacionada con la afinidad: cuanto menor es el valor de KD, mayor es la afinidad del anticuerpo. La afinidad del anticuerpo se refiere a la fuerza con la que el epítopo se une a un paratopo individual (sitio de unión al antígeno) en el anticuerpo. Los anticuerpos de alta afinidad se unen rápidamente al antígeno y mantienen este enlace más fácilmente en diferentes condiciones. La mayoría de los anticuerpos tienen valores de KD en el intervalo de bajo micromolar (10^{-6}) a nanomolar (10^{-7} a 10^{-9}). Los anticuerpos de alta afinidad generalmente se consideran en el intervalo nanomolar bajo (10^{-9}).

45 Brevemente, la proteína KRAS G12D a una concentración definida se hizo fluir sobre el chip sensor recubierto de anticuerpo anti-KRAS (chip sensor de proteína A) y la respuesta se capturó a lo largo del tiempo, mostrando el progreso del ciclo de interacción y asociación/disociación. La respuesta mide los cambios en el índice de refracción y está relacionada con las variaciones de masa cerca de la superficie del sensor. Por tanto, la respuesta es proporcional al número de moléculas de antígeno que interactúan con los anticuerpos. Después de evaluar sucesivamente diferentes concentraciones de proteína KRAS G12D (la regeneración se realiza para eliminar toda la proteína unida restante del chip de una concentración a otra), se calcularon los parámetros cinéticos y la afinidad mediante el uso del programa informático de evaluación BIA. KD (M) de los anticuerpos anti-KRAS D113 y D210 fueron 4.98×10^{-9} y 3.75×10^{-9} , respectivamente.

50 Conclusión:

55 Ambos anticuerpos anti-KRAS G12D, D210 y D113, mostraron valores de KD similares en el intervalo nanomolar bajo, lo que es indicativo de una alta afinidad por la diana (proteína KRAS G12D).

EJEMPLO 3: Formulación de diferentes nanocápsulas poliméricas para la asociación y liberación eficiente de AcM anti-KRAS

- 5 Este ejemplo ilustra la formulación de diferentes nanocápsulas poliméricas para la asociación y liberación eficiente de anticuerpos monoclonales (AcM) anti-KRAS. Las cubiertas que forman polímeros pueden prepararse a partir de políacidos biodegradables, que pueden funcionalizarse adicionalmente, covalentemente o electrostáticamente, con ligandos de direccionamiento y/o que penetran en el tumor/tejido como, por ejemplo, tLyp-1. Más abajo, se describe la preparación de polímeros funcionalizados mediante unión covalente o interacción iónica simple del ligando de direccionamiento tLyp-1. En segundo lugar, se detalla la preparación y caracterización de nanocápsulas cargadas con AcM anti-KRAS y fabricadas con diferentes polímeros.

Preparación de polímero de PSA funcionalizado covalentemente (PSA-tLyp-1)

- 15 El ácido polisiálico (PSA, 28 kDa, Instituto de Sueros de la India) se modificó con la sal trifluoroacetato de N-(2-aminoethyl)maleimida mediante el uso de la siguiente relación molar N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato (EDC)/sal de trifluoroacetato de N-hidroxisuccinimida (NHS)/N-(2-aminoethyl)maleimida (AEM)/tLyp-1: 11.6/2/0.40/0.0283. Para ello, se disolvió PSA en tampón MES 0.1M a pH 6 a una concentración final de 2 mg/ml, y la cantidad correspondiente de EDC, NHS y AEM también se disolvió en tampón MES 0.1M, añadido a la solución de PSA, y se mantuvo bajo agitación magnética durante 4 horas a temperatura ambiente. El PSA funcionalizado con maleimida (PSA-Mal) se purificó mediante diálsis (celulosa regenerada, SnakeSkin 7 KDa MWCO, Thermo Scientific), primero contra NaCl 50 mM y después contra agua. Para la segunda reacción, se disolvió PSA-Mal en una solución de tampón MES 0.1M y NaCl 50 mM a una concentración final de PSA de 1 mg/ml. El péptido se añadió a esta solución y la mezcla de reacción se mantuvo durante 4 horas bajo agitación magnética a temperatura ambiente, y el producto final de PSA-tLyp-1 se purificó mediante diálsis como se describió anteriormente, se liofilizó y se almacenó a 4 °C.

Preparación de polímeros PSA y C16-HA funcionalizados electrostáticamente (PSA+tLyp-1; C16-HA+tLyp-1)

- 30 Se modificaron electrostáticamente ácido polisiálico (PSA, 28 kDa, Instituto de Sueros de la India) y C16-HA (Mw de 216 kDa y grado de sustitución de alquilo del 5 %, Contipro) con el ligando de direccionamiento tLyp-1. Primero, se disolvió PSA o C16-HA en tampón MES 0.1M a pH 6 a una concentración final de 1 mg/ml y se añadió a esta solución la cantidad correspondiente de péptido tLyp-1. La mezcla de reacción se mantuvo durante 4 horas con agitación magnética a temperatura ambiente y los productos finales se purificaron mediante diálsis como se describió anteriormente, se liofilizaron y se almacenaron a 4 °C.

Preparación de nanocápsulas poliméricas

- 40 Las nanocápsulas con recubrimiento polimérico de PSA (28 kDa, Instituto de Sueros de la India), o PSA-tLyp-1, o HA (290 kDa, Lehvoss Iberica), o C16-HA (Mw de 216 kDa y grado de sustitución de alquilo del 5 %, Contipro), o C16-HA + tLyp-1, se prepararon mediante una técnica de autoemulsión. Primero, se pesaron 59 mg de polisorbato 80 (Tween 80®, Merck) y 58 mg de triglicéridos caprílico/cáprico (Mygliol® 812N, IOI Oleochemical GmbH) en un vial de vidrio de 2 ml de capacidad (fase oleosa). Después, para aquellas formulaciones que contienen polímeros no modificados hidrófobamente o no anfifílicos como cubiertas, se agregó un surfactante catiónico a la fase oleosa (4 microlitros de cloruro de bencetonio previamente solubilizado en etanol, 50 mg/mL), de lo contrario no es imprescindible ya que la presencia de cadenas de alquilo/componentes hidrófobos promueve la unión del polímero mediante su inserción en la nanogota oleosa. Todos los componentes de la fase oleosa se mantuvieron bajo agitación magnética (500 rpm). En paralelo, la fase acuosa se preparó solubilizando, por separado, cada polímero a concentraciones variables (por ejemplo, para formulaciones a base de PSA a 3 mg/ml, para formulaciones a base de HA a 0.25-0.5 mg/ml) y Macrogol 15 hidroxiestearato (Kolliphor HS15®, BASF) en PBS pH 7.3 25 mM a una concentración de 20 mg/ml. Después de eso, se mezclaron convenientemente 0.75 ml de la solución de polímero con 125 microlitros de la solución de Kolliphor y esta fase acuosa se añadió sobre la fase oleosa con agitación magnética (1100 rpm).

- 55 Proceso de asociación del AcM usado para asociar los AcM anti-KRAS anti-G12V (DWP) y anti-G12D (D113 y D210)

El volumen requerido de AcM anti-KRAS para obtener la concentración final del AcM deseada (por ejemplo, 1, 2 o 3 mg/ml) se añadió a la fase acuosa antes de mezclarla con la fase oleosa.

- 60 Caracterización fisicoquímica

Las nanocápsulas se caracterizaron en términos de tamaño medio de partícula e índice de polidispersidad (PI) mediante espectroscopía de correlación de fotones (PCS). Las muestras se diluyeron en agua MilliQ y el análisis se

realizó a 25 °C con un ángulo detección de 173 °C. Las mediciones del potencial zeta se realizaron mediante anemometría láser Doppler (LDA) y las muestras se diluyeron en agua ultrapura. Los análisis PCS y LDA se realizaron por triplicado mediante el uso de un NanoZS® (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). Como se indica de otra manera, los resultados correspondientes a 3 repeticiones se muestran en las Tablas 5 y 6.

5 Eficiencia de asociación. Para determinar la asociación de los AcM anti-KRAS a las nanocápsulas, primero se diluyó una alícuota de cada formulación diferente en PBS y después se filtró (1 ml) en Amicon Stirred Cells® (polietersulfona Biomax® 500 KDa Ultrafiltration Discs, Merck) a 4°C bajo 1 bar de presión de nitrógeno. La eficiencia de asociación se calculó indirectamente como: [(AcM total - AcM libre)/AcM total]*100. Los resultados obtenidos para 10 anti-KRAS G12V y anti-KRAS G12D se muestran en las tablas 5 y 6, respectivamente, más abajo.

Tabla 5:

Formulación	concentración final del AcM (mg/ml)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Z (mV)	% AcM asociado
C16-HA 216 KDa SD5 %	1	131±10	0.28	-13±2	67±3
C16-HA 216 KDa SD5 %	1.66	147±12	0.20	-7±2	82±2
C16-HA+tLyp-1 216 KDa SD5 %*	1.66	179±3	0.31	-5±3	n.d
HA 290 KDa	2	139±6	0.29	-6±3	n.d
HA 290 KDa	3	151±7	0.29	-3±3	n.d
PSA 28 KDa	1	165±18	0.27	-7±1	n.d
tLyp-PSA 28 KDa *	1	160±4	0.25	-6±2	n.d
tLyp-PSA 28 KDa	2	136±15	0.28	-6±2	n.d
PSA+tLyp-1 28 KDa *	1.66	177±6	0.36	-2±2	n.d

n.d.: no determinado; PI: índice de polidispersidad; *n=2

15

Tabla 6:

Formulación	AcM anti-KRAS G12D	concentración final del AcM (mg/ml)	Tamaño (nm)	PI	Potencial Z (mV)	% AcM asociado
HA 290 KDa	D210	1	145±5	0.24	-1±1	60±17
HA 290 KDa	D113	1	131±5	0.28	-8±1	59±13
C16-HA KDa SD5 %		1.5	139±4	0.27	-8±0	n.d
PSA 28 KDa		1.5	175±2	0.29	-5±0	54±5

nd: no determinado; PI: índice de polidispersidad

Estudios de liofilización

20

Se realizaron estudios preliminares de liofilización para evaluar la posibilidad de procesar suspensiones de nanocápsulas que contienen AcM anti-KRAS como polvos para almacenamiento a largo plazo. Se prepararon nanocápsulas cargadas con AcM anti-KRAS de PSA mediante el método explicado anteriormente (lote de 10 ml) y se añadió una solución concentrada de trehalosa a la suspensión de nanocápsulas (concentración final de trehalosa al 10 % p/v) antes de la liofilización. Se analizaron las características de las nanocápsulas liofilizadas, antes y después de la liofilización (FD) en diferentes momentos de reconstitución durante el almacenamiento a 4 °C, por medición del tamaño de partícula, PI, pH, potencial Zeta, eficiencia de asociación y contenido total de AcM (por ELISA). Las mediciones se realizaron de la misma manera que se describió anteriormente. Los resultados correspondientes a 3 réplicas se muestran en la Tabla 7 más abajo, donde se muestra que no se produjeron cambios significativos en términos de propiedades fisicoquímicas y % de AcM, ya sea asociados a las nanocápsulas o simplemente presentes en la formulación.

Tabla 7:

Formulación		Tamaño (nm)	pH	PI	Potencial Z (mV)	% AcM asociado	% AcM Total
PSA 28 kDa	Antes FD	100±1	7.30	0.22	-7±1	63±5	101±8
	Después FD	117±5	7.29	0.22	-5±1	53±10	105±1
	1 mes	114±2	7.29	0.18	-7±1	47±8	95±12
	2 meses	114±4	7.21	0.21	-4±4	47±9	n.d.

FD: liofilización; nd: no determinado; PI: índice de polidispersidad

5 **Conclusiones:** Los anticuerpos monoclonales anti-KRAS se asociaron eficientemente (55-80 %) a diferentes composiciones de nanocápsulas poliméricas. Las nanocápsulas presentaron características fisicoquímicas adecuadas. También se demostró la posibilidad de ser procesados como polvos para almacenamiento a largo plazo mediante liofilización.

10 **EJEMPLO 4:** Estabilidad en plasma de diferentes nanocápsulas poliméricas cargadas con AcM anti-KRAS

15 Con frecuencia, la falta de eficacia de los nanoportadores es el resultado de su agregación en medios complejos. Esto puede resultar de la alta fuerza iónica y/o la presencia de proteínas en medios biológicos. Por lo tanto, se estudió la estabilidad en el plasma de diferentes nanocápsulas poliméricas cargadas con AcM anti-KRAS. Su estabilidad se tomó como un indicador de su potencial para la administración parenteral de los AcM.

20 **Estabilidad en plasma.** Se incubaron nanocápsulas cargadas con anti-KRAS G12V preparadas como se describe en el Ejemplo 3 en plasma humano (dilución 1:10, a 37 °C) bajo agitación horizontal (300 rpm, Heidolph Instruments GmbH & Co.). En momentos predeterminados, se extrajeron muestras del medio de incubación para el análisis del tamaño de partícula por un Malvern Zeta-Sizer y para el análisis de tamaño y distribución de tamaño por Análisis de Seguimiento de Nanopartículas (NTA). Las muestras se analizaron después de una dilución adicional apropiada (1:10 000 en PBS pH 7.4 10 mM para NTA; 1:1000 en agua para dispersión dinámica de luz (DLS)).

25 La estabilidad de una formulación representativa (nanocápsulas de HA cargadas con AcM anti-KRAS, concentración de AcM de 0.5 mg/ml) medida por DLS y NTA se muestra en las Figuras 1 y 2, respectivamente.

30 **Conclusión:** las nanocápsulas cargadas de AcM mostraron una estabilidad adecuada en el plasma humano durante al menos 24 horas, lo que representa un beneficio importante para ser administrado por vía parenteral a un sujeto.

35 **EJEMPLO 5:** Internalización celular in vitro de nanocápsulas cargadas con AcM anti-KRAS G12V en células de adenocarcinoma de colon que expresan la mutación KRAS G12V

Este ejemplo ilustra la internalización celular del AcM anti-KRAS G12V en una línea celular de adenocarcinoma de colon SW480 que expresa la mutación KRAS G12V. El anticuerpo se marcó primero con un marcador fluorescente (Alexa Fluor® 488) y después se asoció a las nanocápsulas. Se evaluó la conservación de las propiedades de las nanocápsulas después de cargar el anticuerpo fluorescente.

Marcaje del AcM anti-KRAS con Alexa Fluor® 488

40 Brevemente, el AcM se diluyó a una concentración de 2 mg/ml en 1x PBS (pH 7.2-8.0). Después, se añadieron 50 µl de tampón de bicarbonato de sodio 1M a 0.5 ml de solución de AcM (2 mg/ml) (el pH final debe estar entre 7.5 y 8.0). Se añadió entonces la solución a un vial del colorante reactivo específico suministrado con el Kit de Marcaje de Proteína Alexa Fluor® 488 (Thermo-Fisher) y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de eso, la solución se mantuvo durante la noche a 2-8 °C. La columna de purificación/resina se preparó mediante la adición de la resina dentro de una columna de plástico, suministrada con el kit, hasta alrededor de 3 cm desde la parte superior, y el exceso de tampón se drenó antes de cargar la proteína marcada (una vez a temperatura ambiente). Cuando toda la solución penetró en la resina, se añadió 1x PBS para eluir la proteína. Después, se recolectó la fracción que contenía la proteína marcada (colocada en la parte inferior) y se calculó la concentración de proteína (M) y el Grado de marcaje de acuerdo con la Ecuación 1 y 2, respectivamente:

$$\text{Concentración de proteínas(M)} = \frac{[\text{A280} - (\text{A494} \times 0.11)] \times \text{factor de dilución}}{203\,000}$$

Donde 203 000 cm⁻¹M⁻¹ es el coeficiente de extinción molar de una IgG típica y 0.11 es el factor de corrección para tener en cuenta la absorción del colorante a 280 nm.

5

$$\text{Moles de colorante por mol de proteína} = \frac{[\text{A494}] \times \text{factor de dilución}}{71\,000 \times \text{concentración de proteína (M)}}$$

Donde 71 000 cm⁻¹M⁻¹ es el coeficiente de extinción molar aproximada del colorante Alexa Fluor® 488 a 494 nm.

10 El grado de marcaje resultó ser 5 moles del colorante Alexa Fluor® 488 por mol de AcM, que está dentro del rango óptimo de acuerdo con las especificaciones del kit (4-9 moles del colorante Alexa Fluor® 488 por mol de AcM).

Preparación de nanocápsulas que contienen un AcM anti-KRAS G12V marcado con fluorescencia

15 Para estos estudios, se prepararon formulaciones de nanocápsulas poliméricas como se describió anteriormente (Ejemplo 3) mediante el uso del AcM anti-KRAS G12V previamente marcado con Alexa Fluor® 488 (concentración final del AcM: 1 mg/ml). Los resultados de la caracterización en términos de tamaño, polidispersidad y potencial zeta se muestran en la Tabla 8.

20 Tabla 8:

Formulación	Tamaño (nm)	PI	Potencial Z (mV)
HA 290 KDa*	143 ± 1	0.25	-1 ± 1
PSA 28 KDa*	122 ± 1	0.24	-3 ± 1

*n=2

Estudio de internalización celular in vitro

25 Se usó un citómetro de flujo de imágenes (ImageStream®) para investigar la capacidad de las nanocápsulas para provocar una internalización efectiva del anticuerpo anti-KRAS asociado en las células. Brevemente, las nanocápsulas cargadas con Alexa Fluor® 488 se incubaron en placas de 24 pocillos con células SW480, mediante el uso de pocillos separados para cada punto de tiempo a estudiar (por ejemplo, 0, 4 horas y 8 horas). En cada punto de tiempo predeterminado, las células se trisnizaron y las imágenes se adquirieron en el dispositivo ImageStream®. La internalización efectiva se determinó marcando los orgánulos ácidos del citoplasma con el marcador fluorescente Lysotracker® para células vivas, y se confirmó adicionalmente mediante microscopía confocal (datos no mostrados). Las imágenes representativas se muestran en la Figura 3.

35 Conclusión: Las NC de polímero (HA) permitieron la internalización eficiente de un AcM anti-KRAS G12V marcado con fluorescencia en células SW480 que expresan la mutación KRAS G12V. El anticuerpo internalizado mostró una localización preferencial en el sitio diana, es decir, en el lado interno de la membrana plasmática, donde se localiza el KRAS oncogénico.

40 **EJEMPLO 6. Efectos de la internalización celular in vitro de nanocápsulas cargadas con AcM anti-KRAS G12V en células de adenocarcinoma de pulmón que expresan la mutación KRAS G12V**

Este ejemplo ilustra los efectos de las nanocápsulas poliméricas cargadas con AcM anti-KRAS G12V sobre la inhibición de la proliferación celular y la señalización de RAS en una línea celular que expresa la mutación KRAS G12V (células de cáncer de pulmón adenocarcinoma H441).

Ensayo de proliferación celular

50 Se sembraron células de cáncer de pulmón de adenocarcinoma H441 a una densidad de 8000 células por pocillo en placas de 96 pocillos o 75 000 células por pocillo en placas de 24 pocillos, se cultivaron durante la noche y después se trataron con las dosis de anticuerpos indicadas en la Tabla 9, más abajo, durante 3 días. Despues de los 3 días de incubación, las células se recolectaron, y las células viables se determinaron mediante MTT (estudios en placa de 96 pocillos) o tinción con azul tripán (estudios en placa de 24 pocillos). Los resultados se presentaron como el porcentaje de células viables en relación con el de los respectivos controles tratados con nanocápsulas en blanco.

5 Tabla 9: Inhibición de la proliferación celular en células de cáncer de pulmón de adenocarcinoma H441 que expresan la mutación KRAS G12V provocada por prototipos de nanocápsulas (NC) de C16-HA, HA y PSA (diferentes dosis/célula).

Formulación	Dosis de aG12V (ng/célula)	Experimento individual	Inhibición de la proliferación celular frente a NC en blanco
C16-HA	0.4	#1	40 %
		#2	30 %
		#2	32 %
		#3	39 %
PSA	0.4	#2	25 %
HA	0.27	#4	35 % *
	0.4	#4	54 % *
aG12V control	0.4	#4	0 % *

(*) Estudios en placa de 24 pocillos

10 Transferencia Western. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos, se cultivaron durante la noche y después se trataron con NC C16-HA (NC en blanco y cargadas con AcM anti-KRAS G12V a 166 nM del AcM, 0.4 ng AcM/dosis célula) durante 20 horas. La transferencia Western se realizó mediante el uso de anticuerpos específicos siguiendo procedimientos estándar. Para la cuantificación de los datos de transferencia Western, las intensidades de las bandas se cuantificaron mediante el uso del programa informático ImageJ y se normalizaron a los valores del control de carga. Los niveles de fosforilación de proteínas se normalizaron con respecto a los niveles totales de cada proteína, cargadas de forma equivalente en geles SDS-PAGE. La intensidad de la banda relativa se expresó como el porcentaje de reducción en comparación con el valor del control correspondiente (control tratado con nanocápsulas en blanco). Las exploraciones de las transferencias Western se muestran en la Figura 4B, junto con la correspondiente inhibición de la proliferación celular (Figura 4A) obtenida en un experimento realizado en paralelo.

20 Figura 4A: inhibición de la proliferación celular y Figura 4B: reducción de la fosforilación de ERK producida después de la incubación con C16-HA NC (nanocápsulas en blanco y cargadas con AcM anti-KRAS G12V a 166 nM de AcM, 0.4 ng de AcM/dosis celular) en células cancerosas de adenocarcinoma de pulmón H441 que expresan la mutación KRAS G12V [C (-): células no tratadas; BL: NC de C16-HA en blanco; aG12V NC: NC C16-HA cargadas con anti-KRAS G12V].

25 Conclusiones: Las nanocápsulas poliméricas cargadas con AcM anti-KRAS G12V inhibieron el crecimiento in vitro de células tumorales mutantes KRAS G12V en porcentajes que varían del 25 a > 50 % en dependencia de las condiciones experimentales. La interferencia en la vía de señalización RAS se evidenció por una reducción del 30-40 % en la fosforilación de ERK determinada por transferencia Western.

30 **EJEMPLO 7: Ensayos in vivo: eficacia de nanocápsulas que contienen AcM anti-KRAS G12V en la reducción del crecimiento tumoral en dos modelos de ratones portadores de la mutación KRAS G12V: xenoinjerto pancreático subcutáneo y modelos de tumor ortotópico de colon**

35 Este ejemplo ilustra la capacidad de las nanocápsulas poliméricas de PSA-tLyp-1 cargadas con AcM anti-KRAS G12V para reducir el crecimiento tumoral en dos modelos de ratones con tumores diferentes; un modelo de tumor de xenoinjerto subcutáneo de páncreas y un modelo de tumor ortotópico de colon.

Modelo de tumor de xenoinjerto subcutáneo de páncreas

40 Se generó un modelo de tumor de xenoinjerto de páncreas mediante la inoculación subcutánea de células PA-TU-8902 que expresan la mutación KRAS G12V en el muslo derecho e izquierdo de ratones Rag2-/ (6 semanas de edad). Cuando el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 150-170 mm³, los ratones se asignaron aleatoriamente a cohortes de tratamiento y se administraron NC PSA-tLyp-1 o un control de vehículo salino por vía intraperitoneal cada 3 días (NC PSA-tLyp-1 a una dosis de 5 mg/kg de dosis de AcM anti-KRAS G12V x 4 administraciones; 120 μ L/dosis). Los volúmenes de los tumores y el peso corporal se registraron a intervalos

regulares. En el momento del sacrificio, los ratones tratados con NC de PSA-tLyp-1 cargadas con AcM anti-KRAS G12V presentaron un porcentaje de crecimiento tumoral aproximadamente 2 veces menor que el control con solución salina (Figura 5). No se registró ningún signo de toxicidad en términos de pérdida de peso corporal y comportamiento animal (datos no mostrados).

5 Modelo de tumor ortotópico de colon
 10 Se implantaron fragmentos de tumor subcutáneo derivados de la línea celular SW480 en el colon de ratones Desnudos Atómicos-Foxn1nu (5 semanas de edad) para generar un modelo de xenoinjerto ortotópico derivado de la línea celular SW480. Tres semanas después de la implantación, los ratones se aleatorizaron y asignados a diferentes grupos para recibir los diferentes tratamientos. Las NC de HA cargadas con AcM anti-KRAS G12V a una dosis de AcM de 10 mg/kg se administraron por vía intravenosa a través de la vena de la cola durante un período de tratamiento de 3 semanas (semana 1: 2 dosis, es decir, 1 dosis cada 3 días; semana 2: 2 dosis, es decir, 1 dosis cada 3 días; semana 3: 4 dosis, es decir, 1 dosis cada 2 días) 150 μ L/dosis). Se administró PBS (control) como control de los animales no tratados en los mismos días. Los pesos finales de los tumores después del sacrificio se muestran en la Figura 6. Para cuantificar el alcance de los cambios de regresión histológica, se escanearon y analizaron los portaobjetos de tumor con el NDP. Programa informático de visualización View2 (Hamamatsu), y se calculó el porcentaje de necrosis en todos los casos. Los resultados de 2 tumores diferentes por grupo de tratamiento se representan en la Figura 7. Se controló el comportamiento y el peso de los ratones durante el tratamiento para detectar cualquier signo de toxicidad del tratamiento (Figura 8).

15 Conclusiones: Las nanocápsulas poliméricas cargadas con AcM anti-KRAS G12V inhibieron significativamente el crecimiento tumoral in vivo en dos modelos diferentes de líneas celulares que expresan KRAS G12V: un modelo de tumor de xenoinjerto subcutáneo de páncreas (células PA-TU-8902) y un modelo de tumor ortotópico colorrectal (células SW480), donde se encontraron cambios de regresión histológica muy notables en términos de necrosis tumoral (> 70 %) en el momento del sacrificio. No se registró pérdida de peso corporal durante el estudio de 3 semanas, por lo que no mostró signos de toxicidad del tratamiento.

30 LISTA DE REFERENCIAS

35 Literatura no relacionada con patentes:

- Cox y otros, 2014. Drugging the undruggable Ras: mission possible? *Nat Rev Drug Discov.* 2014 November; 13(11): 828–851
- Shin y otros, 2017. Antibody targeting intracellular oncogenic Ras mutants exerts anti-tumour effects after systemic administration. *Nat Commun.* 2017 May 10;8: 15090
- Akishiba y otros, 2017. Cytosolic antibody delivery by lipid-sensitive endosomolytic peptide. *Nat Chem.* 2017;9(8):751
- Slastnikova y otros, 2018. Targeted intracellular delivery of antibodies: The state of the art, *Front. Pharmacol.* 2018;9: 1208
- Singh y otros, 2019. Antibody delivery for intracellular targets: Emergent therapeutic potential, *Bioconjugate Chem.* 2019; 30: 1028
- Carney y otros, 1986. Monoclonal antibody specific for an activated RAS protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Oct;83(19):7485-9
- 50 Römpf Lexikon Lacke und Druckfarben, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, N.Y., 1998, “Hydrophilicity”, “Hydrophobicity”, pages 294 and 295.
- Bertrand y otros, 2014. Cancer Nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology, *Advanced Drug Delivery Reviews* 66 (2014) 2-25
- 55 Gilad y otros, 2016. Recent innovations in peptide based targeted delivery to cancer cells, *Biomedicines*, 4 (2016)
- Zhou y otros, 2016. Aptamers: A promising chemical antibody for cancer therapy, *Oncotarget*, 7 (2016) 13446-13463
- 60 Kapp y otros, 2017. A Comprehensive Evaluation of the Activity and Selectivity Profile of Ligands for RGD-binding Integrins. *Sci. Rep.* 7, 39805 (2017)

Ruosahti, 2017. Tumor penetrating peptides for improved drug delivery, Advanced Drug Delivery Reviews, Volumes 110–111 (2017) Páginas 3-12

5 Zhang y otros, 2016. Cell-penetrating peptides as noninvasive transmembrane vectors for the development of novel multifunctional drug-delivery systems, Journal of Controlled Release, Volume 229 (2016) pages 130-139

Regberg y otros, 2012. Applications of cell-penetrating peptides for tumor targeting and future cancer therapies, Pharmaceuticals, 5 (2012) 991-1007

10 Liu P. y otros, 2019. Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy, Acta Pharm. Sin. B., 9 (2019) 871-879

Ferrer y otros, 2018. KRAS-Mutant non-small cell lung cancer: From biology to therapy, Lung Cancer, 124 (2018) 53–64

15 Fisher y otros, 2001. Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes, Genes and Development, 15 (2001) 3249–326

Ying y otros, 2012. Oncogenic Kras Maintains Pancreatic Tumors through Regulation of Anabolic Glucose Metabolism, 149 (2012) 656-670

20 Lee and Mooney, 2012. Alginate: properties and biomedical applications. Prog Polym Sci., 37 (2012) 106–126

Literatura de patentes:

25 EP0190033

US5084380

30 US5443956

WO2019086627A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición, que comprende:
 una pluralidad de nanoentidades que comprenden un núcleo interior rodeado por una capa externa, la capa externa comprende un polímero, el núcleo interno comprende al menos un compuesto hidrófobo, donde las nanoentidades comprenden un agente farmacéutico, donde el agente farmacéutico es un anticuerpo o un fragmento de este, y donde las nanoentidades pueden suministrar intracelularmente el anticuerpo o el fragmento de este, y donde el anticuerpo o el fragmento de este se une a un epítopo intracelular de una proteína KRAS mutada activada.
- 10 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto hidrófobo del núcleo interno comprende un aceite, tensioactivo lipófilo, ácido graso, alcano, cicloalcano, sal biliar, derivados de sales biliares, terpenoide, terpeno, porciones derivadas de terpenos o vitamina lipófila.
- 15 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, donde el compuesto hidrófobo es un aceite.
- 20 4. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
- 25 5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el epítopo de la proteína KRAS mutada activada comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en el residuo de glicina en la posición 12, el residuo de glicina en la posición 13 o el residuo de glutamina en la posición 61 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39.
- 30 6. La composición de acuerdo con la reivindicación 5, donde la mutación en la posición 12 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 se selecciona del grupo que consiste en arginina G12R, ácido aspártico G12D, valina G12V y cisteína G12C.
- 35 7. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el anticuerpo o el fragmento de este se une a un epítopo que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en KLVVVGAVGVGK SEQ ID NO: 40, KLVVVGADGVGK SEQ ID NO: 41 y KLVVVGACGVGK SEQ ID NO: 42.
- 40 8. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el anticuerpo o el fragmento de este se obtiene a partir de una línea celular de hibridoma con un número de depósito seleccionado del grupo que consiste en DSM ACC3358, ATCC-HB-10083 D210, ATCC-HB-8698 DWP, ATCC-HB-10086-D113 y DSM ACC3359.
- 45 9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el anticuerpo o el fragmento de este comprende una región variable de cadena pesada CDR1: (SEQ ID NO: 33) SGYYWN, una región variable de cadena pesada CDR2: (SEQ ID NO: 34) YIGYDGTNNYNNPSLKN, una región variable de cadena pesada CDR3: (SEQ ID NO: 35) LWDY, una región variable de cadena ligera CDR1: (SEQ ID NO: 36) RSSQTIVHGNNGNTYLE, una región variable de cadena ligera CDR2: (SEQ ID NO: 37) TVSNRFS y una región variable de cadena ligera CDR3: (SEQ ID NO: 38) FQGSHAPYT.
- 50 10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el anticuerpo o el fragmento de este comprende una región variable de cadena pesada CDR1: (SEQ ID NO: 45) SYYMY, una región variable de cadena pesada CDR2: (SEQ ID NO: 46) EINPSNGGTNFNEKFKS, una región variable de cadena pesada CDR3: (SEQ ID NO: 47) GGYGY, una región variable de cadena ligera CDR1: (SEQ ID NO: 29) RSSKSLLYKDGGTYLN, una región variable de cadena ligera CDR2: (SEQ ID NO: 30) LMSTRAS y una región variable de cadena ligera CDR3: (SEQ ID NO: 31) QQVVEYPRT.
- 55 11. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde el polímero se selecciona del grupo que consiste en: ácido polisiálico (PSA), ácido hialurónico (HA), ácido poliglutámico (PGA) y/o ácido poliglutámico pegilado (PGA-PEG), ácido poliláctico (PLA) y/o ácido poliláctico pegilado (PLA-PEG), polí(ácido aspártico) (PASP) y/o polí(ácido aspártico) pegilado (PASP-PEG), polí(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y/o polí(ácido láctico-co-glicólico) pegilado (PLA-PEG), ácido algínico (ALG) y/o ácido algínico pegilado (ALG-PEG), ácido polimálico (PLMA) y/o ácido polimálico pegilado (PLMA-PEG) y mezclas de estos.
- 60 12. La composición de acuerdo con la reivindicación 11, donde el polímero es PSA, HA o PGA-PEG.

13. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde la composición comprende una porción de direccionamiento y/o un péptido que penetra en las células.
- 5 14. La composición de acuerdo con la reivindicación 13, donde la composición comprende una porción de direccionamiento que es un péptido CendR seleccionado del grupo que consiste en Lyp-1, tLyp-1, cLyp-1 e iRGD.
15. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde al menos algunos de los polímeros están unidos a una porción hidrófoba.
- 10 16. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, para usar como un medicamento.
- 15 17. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con una mutación en un gen KRAS, donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en cáncer, síndrome de Noonan (SN), síndrome cardiofaciocutáneo (CFC), síndrome de Costello, y nevo epidérmico.
18. Un método para preparar una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende las etapas de:
- 20 a) preparar una fase acuosa que comprende un polímero;
- b) preparar una fase hidrófoba que comprende un compuesto hidrófobo;
- c) añadir un anticuerpo o un fragmento de este que se une a un epítopo intracelular de una proteína KRAS mutada activada a la fase acuosa u, opcionalmente, a la fase hidrófoba si el anticuerpo o el fragmento está muy concentrado; y
- d) mezclar la fase acuosa y la fase hidrófoba.
- 25

Figura 1

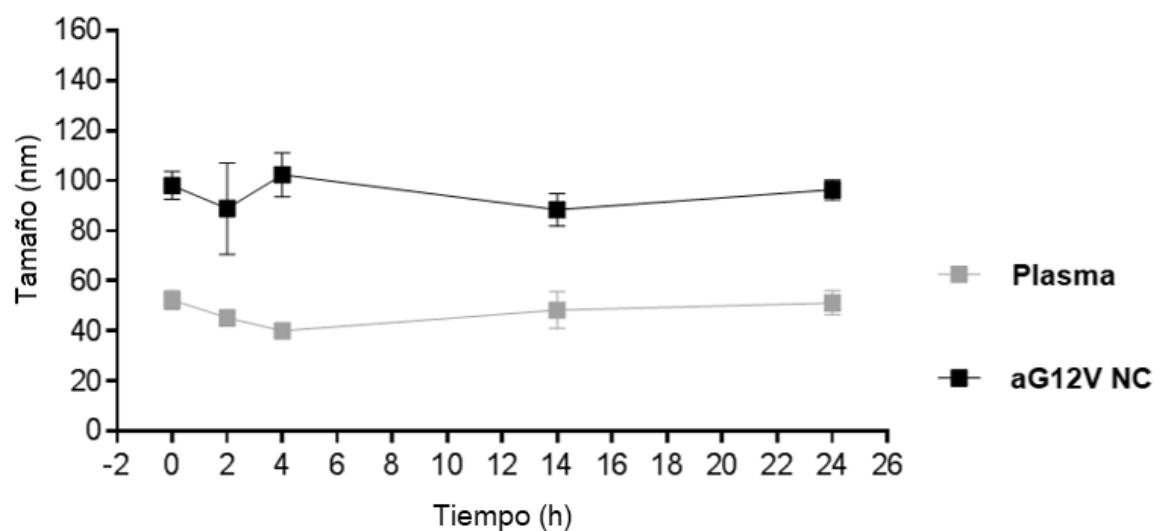


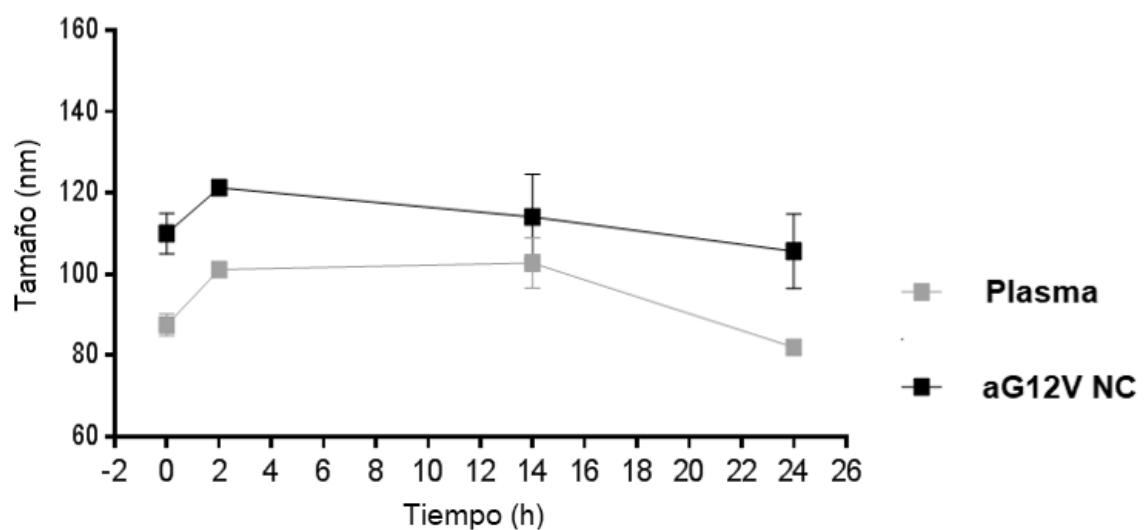
Figura 2

Figura 3

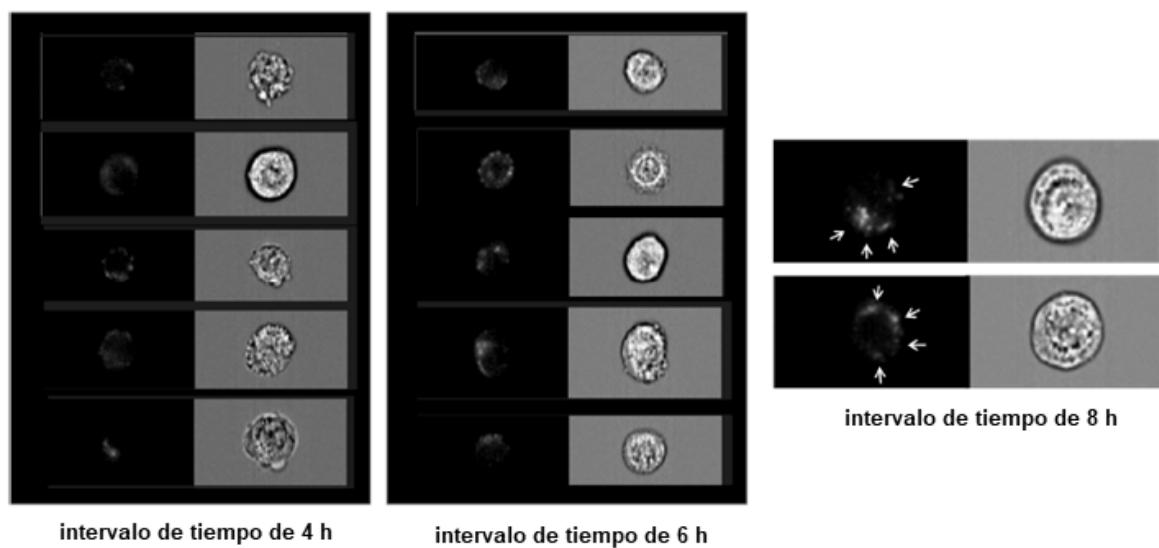


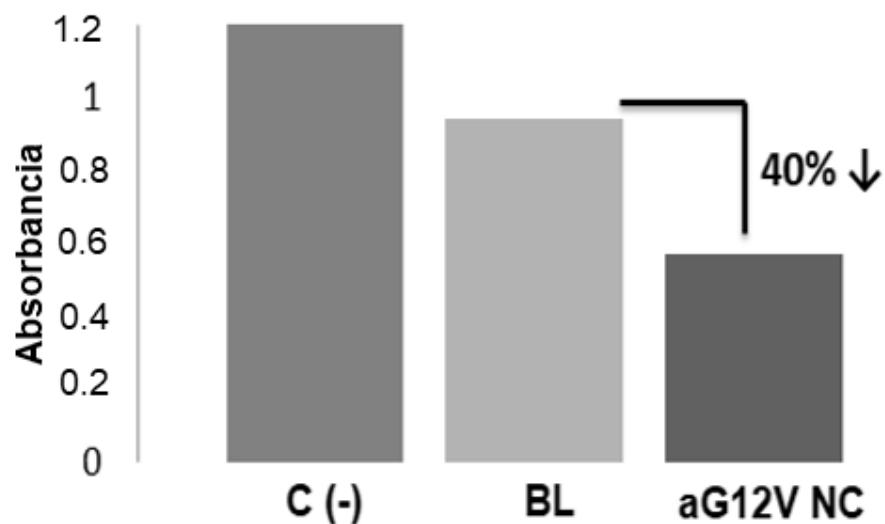
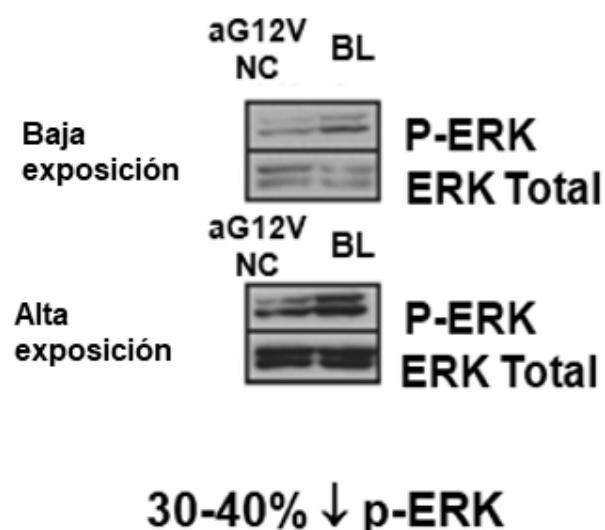
Figura 4A**Figura 4B**

Figura 5

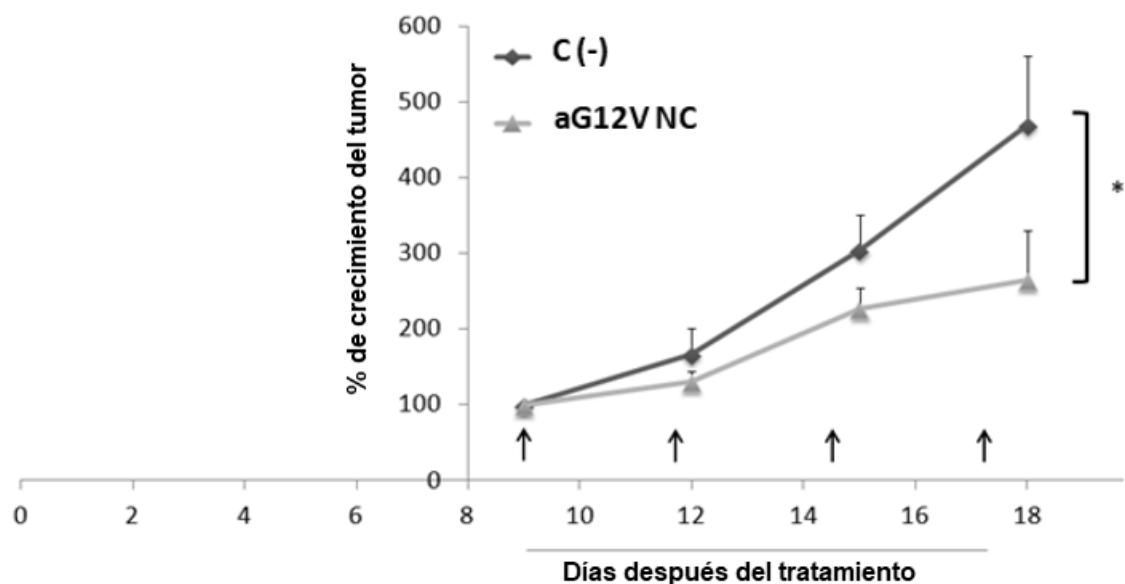


Figura 6

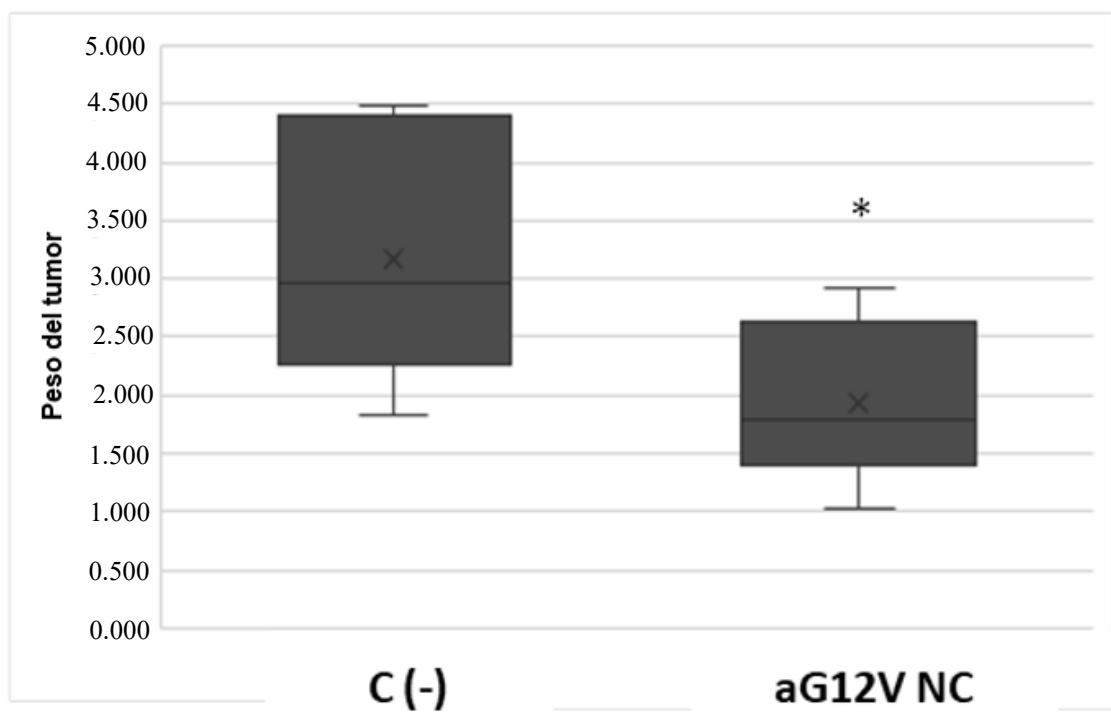


Figura 7

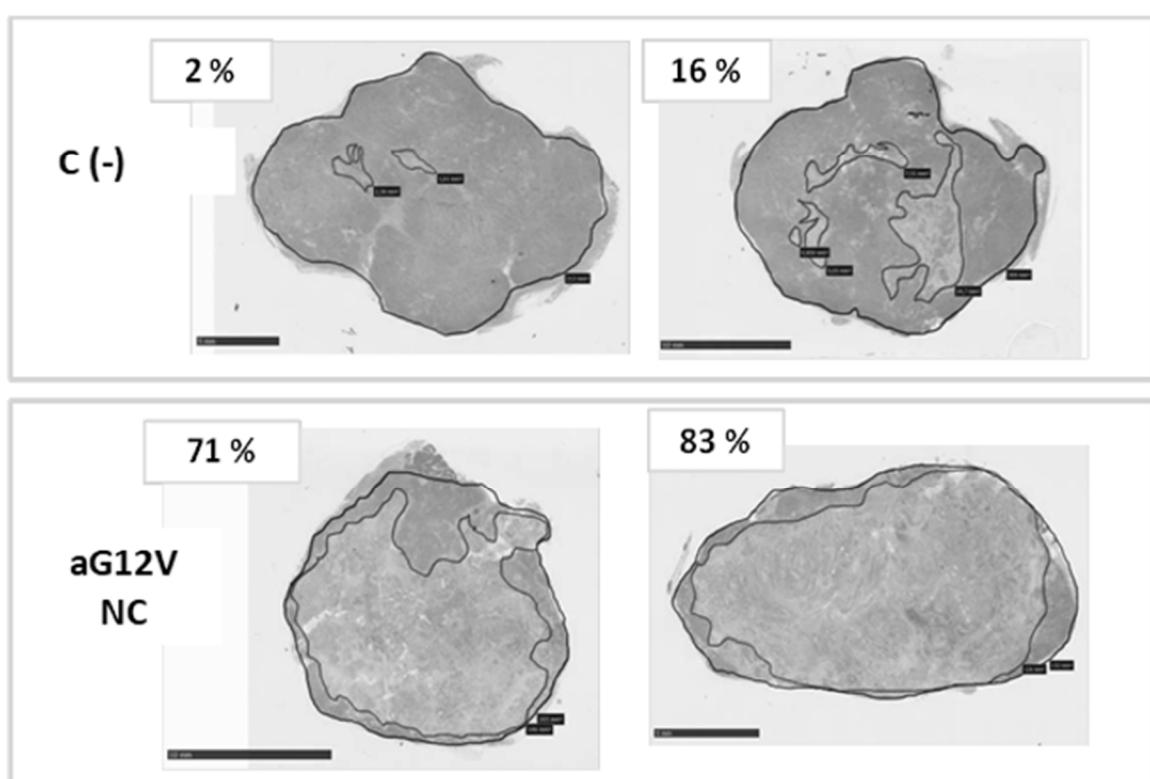


Figura 8

