

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 236**

51 Int. Cl.:

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.10.2018** **PCT/US2018/055836**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2019** **WO19079164**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2018** **E 18869033 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2024** **EP 3697387**

54 Título: **Combinación de AS1411 y SAPC-DOPS para el tratamiento de glioblastoma multiforme**

30 Prioridad:

16.10.2017 US 201762572605 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
30.09.2024

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF CINCINNATI (100.0%)
2900 Reading Road, Suite 460
Cincinnati, OH 45206, US

72 Inventor/es:

QI, XIAOYANG y
SHUKLA, NIKHIL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 980 236 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

Combinación de AS1411 y SAPC-DOPS para el tratamiento de glioblastoma multiforme

Referencia a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos número 62/572.605 presentada el 16 de octubre de 2017.

Campo de la invención

La presente descripción se refiere a métodos para tratar glioblastoma multiforme (GBM). Específicamente, la descripción se refiere a una terapia de combinación que comprende el aptámero para nucleolina AS1411 y saposina C y dioleoilfosfatidilserina (SapC-DOPS) para el tratamiento de GBM.

Antecedentes de la invención

El glioblastoma multiforme (GBM) es el más común de los tumores cerebrales y uno más mortales. Estos tumores tienden a ser agresivos y resistentes a fármacos y los pacientes tienen típicamente opciones terapéuticas limitadas. Aunque ha habido avances en la radiación y quimioterapia en las últimas décadas, la supervivencia media sigue siendo baja a <15 meses.

SapC-DOPS (Fig. 1A), también conocida como BXQ-350, es una nanovesícula estable que ahora está siendo objeto de estudio en ensayos clínicos de fase 1. Está compuesta por saposina C (SapC), una proteína lisosomal que cataboliza glicoesfingolípidos y el fosfolípido dioleoilfosfatidilserina (DOPS). Se sabe que SapC-DOPS se dirige selectivamente a tumores *in vivo* mediante la unión a fosfatidilserina de superficie (PS) y que niveles más altos de PS de superficie se correlacionan con la sensibilidad a SapC-DOPS. Estudios previos han mostrado que SapC-DOPS cruza con éxito la barrera hematoencefálica y puede liberar agentes de contraste de resonancia magnética a tumores cerebrales ortotópicos en ratones. Wolton, *et al.*, Systemic Delivery of SapC-DOPS Has Antiangiogenic and Antitumor Effects Against Glioblastoma, *Molecular Therapy* 21(8): 1517-25 (2013). Sin embargo, en comparación con otros modelos tumorales, los modelos de GBM han sido relativamente resistentes a SapC-DOPS.

AS1411 (Fig. 1B) es un aptámero oligonucleotídico rico en guanina de 26 pares de bases para nucleolina, una fosfoproteína localizada principalmente en el nucleolo pero que a veces se encuentra en la superficie celular en células cancerosas, que se ha demostrado que tiene actividad anticancerosa selectiva en una diversidad de líneas celulares tumorales. AS1411 es el primer aptámero que puede progresar con éxito a ensayos clínicos. Estudios previos han mostrado que AS1411 induce un mecanismo no apoptótico de muerte celular conocido como metuosis. Los efectos anticancerosos de AS1411 se han descrito bien en cánceres de mama, pulmón, próstata y células renales. Bates *et al.*, *Discovery and Development of the G-rich Oligonucleotide AS1411 as a Novel Treatment for Cancer*, *Exp Mol Pathol.* 86(3): 151-154 (2009). Sin embargo, el efecto anticanceroso de AS1411 en GBM es relativamente desconocido. Un estudio ha elucidado efectos citotóxicos modestos de AS1411 en células de glioblastoma U87-MG. Este estudio propone que AS1411 induce apoptosis debido a aumentos en PS de superficie, un marcador indirecto de apoptosis y elevaciones en el gen supresor tumoral p53. Estos resultados contrastan con estudios previamente bien descritos que muestran que AS1411 causa muerte celular inducida por metuosis en otras líneas celulares tumorales. Además, las células U87-MG muestran niveles relativamente altos de resistencia a AS1411 cuando se comparan con líneas celulares tumorales no GBM (CI₅₀ 10 µM frente a 1 µM). Cheng, *et al.*, AS1411-Induced Growth Inhibition of Glioma Cells by Up-Regulation of p53 and Down-Regulation of Akt-2 and Akt1 via Nucleolin, *PLoS One* 11(12) (2016).

Existe la necesidad de tratamientos mejorados para glioblastoma multiforme.

Compendio de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Formas de realización que no están dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas no forman parte de la invención. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) por terapia. El siguiente compendio de la invención se proporciona para facilitar una comprensión de algunas de las características innovadoras únicas de la presente invención. Se puede obtener una apreciación completa de los diversos aspectos de la invención tomando toda la memoria descriptiva, las reivindicaciones, los dibujos y el resumen en su conjunto.

En una forma de realización, se proporciona una combinación de agentes terapéuticos que comprende: saposina C y dioleoilfosfatidilserina (SapC-DOPS); y aptámero de nucleolina AS1411, para su uso en un método para inducir la muerte celular en una célula cancerosa de glioblastoma multiforme, donde se induce la muerte celular de la célula cancerosa.

En otra forma de realización, se proporciona una combinación de agentes terapéuticos que comprende: saposina C y dioleoilfosfatidilserina (SapC-DOPS); y aptámero de nucleolina AS1411, para su uso en un método para tratar cáncer de glioblastoma multiforme en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar la combinación al sujeto.

También se describe en el presente documento un método para inhibir el crecimiento de un tumor de glioblastoma

multiforme (GBM) en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto una combinación de agentes terapéuticos que comprende: saposina C y dioleoilfosfatidilserina (SapC-DOPS); y aptámero de nucleolina AS1411, donde se inhibe el crecimiento del tumor.

5 También se describe en el presente documento un kit para el tratamiento de glioblastoma multiforme (GBM), comprendiendo el kit: una primera composición farmacéutica que comprende saposina C y dioleoilfosfatidilserina (SapC-DOPS); y una segunda composición farmacéutica que comprende el aptámero de nucleolina AS1411.

10 En otra forma de realización, se proporciona una composición farmacéutica, comprendiendo la composición: saposina C y dioleoilfosfatidilserina (SapC-DOPS), donde SapC-DOPS está presente como nanovesículas; y aptámero de nucleolina AS1411, donde AS1411 se encapsula dentro de las nanovesículas de SapC-DOPS; y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1. A) Se ilustra la estructura de SapC-DOPS; **B)** Se ilustra la estructura del dímero cuádruplex de AS1411.

15 **Fig. 2. A)** SapC-DOPS y AS1411 muestran efectos citotóxicos combinados significativos potenciados en células U87-MG; AS1411 4 μ M con SapC-DOPS 40 μ M. **B)** AS1411 4 μ M con SapC-DOPS 50 μ M. La viabilidad celular se analizó 96 horas después del tratamiento con el ensayo de proliferación celular MTT. Las barras de error muestran la media \pm DT con $p < 0,02$ mediante la prueba t de Student cuando se comparan con las ramas de control o de tratamiento con un solo fármaco.

20 **Fig. 3. A)** AS1411 aumenta la PS de superficie en células U87-MG sin aumentar la PI; Las células se trataron con AS1411 6 μ M durante 24, 48, 72 h y se analizaron mediante citometría de flujo usando tinción con anexina V-FITC. Las barras de error muestran la media \pm DT con $** p < 0,02$ mediante la prueba t de Student cuando se comparan con células de control (no tratadas). **B)** Histogramas que muestran el aumento en la PS de superficie en células tratadas a las 72 horas. **C)** El número de células positivas (muertas) para yoduro de propidio (PI) no aumenta después del tratamiento con AS1411 6 μ M.

25 **Fig. 4.** muestra que AS1411 no aumenta la actividad caspasa tanto como el fármaco apoptótico temozolomida (TMZ); Células U87-MG tratadas con TMZ 100 μ M durante 48 horas y AS1411 15 μ M durante 72 horas. La actividad caspasa se midió con un kit ELISA de caspasa-3. Los niveles de caspasa se normalizaron a la proteína celular total con el ensayo de proteína BCA. Las barras de error muestran la media \pm DT. Los resultados indican que la apoptosis no es la principal vía de muerte celular desencadenada por AS1411.

30 **Fig. 5. A)** AS1411 induce vacuolización similar a metuosis en células U87-MG, células U87-MG no tratadas; **B)** Células U87-MG tratadas con MIPP 10 μ M durante 24 horas; **C)** Células U87-MG tratadas con AS1411 15 μ M durante 72 horas. **D)** Células U87-MG tratadas con AS1411 15 μ M durante 192 horas. **E)** Cuantificación del número de células con >5 vacuolas.

35 **Fig. 6. A)** AS1411 encapsulado en SapC-DOPS muestra efectos citotóxicos combinados, mejorados, significativos en células U87-MG; AS1411 4 μ M encapsulado en SapC-DOPS 40 μ M. **B)** AS1411 4 μ M encapsulado en SapC-DOPS 50 μ M. Las barras de error muestran la media \pm DT con $p < 0,02$ mediante la prueba t de Student cuando se comparan con las ramas de control o de tratamiento con un solo fármaco.

40 **Fig. 7. A)** AS1411 encapsulado en SapC-DOPS muestra efectos citotóxicos combinados, mejorados, significativos en células U87-MG; AS1411 4 μ M encapsulado en SapC-DOPS 40 μ M. **B)** 4 AS1411 μ M encapsulado en SapC-DOPS 50 μ M. Las barras de error muestran la media \pm DT con $p < 0,02$ mediante la prueba t de Student cuando se comparan con las ramas de control o de tratamiento con un solo fármaco.

Listado de secuencias

El solicitante incorpora aquí un listado de secuencias de CRF presentado.

45 Las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos enumeradas en el listado de secuencias adjunto se muestran usando abreviaturas de letras convencionales para bases nucleotídicas tal como se define en 37 C.F.R. 1.822. Sólo se muestra una hebra de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la hebra complementaria se incluye por cualquier referencia a la hebra mostrada. En el listado de secuencias adjunto:

SEQ ID NO: 1 representa una secuencia peptídica de saposina C.

SEQ ID NO: 2 representa una secuencia de ácido nucleico de AS1411.

Descripción detallada

50 La siguiente descripción de formas de realización particulares es de naturaleza meramente ejemplar. La invención se describe con relación a las definiciones y terminología incluidas en el presente documento.

La terminología usada en el presente documento tiene el único propósito de describir formas de realización particulares y no pretende ser limitante. Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el" pretenden incluir las formas plurales, incluyendo "al menos uno", a menos que el contenido indique claramente lo contrario. "O" significa "y/o". Como se usa en el presente documento, el término "y/o" incluye cualquiera y todas las combinaciones de uno o más de los elementos enumerados asociados. Se entenderá además que los términos "comprende" y/o "que comprende", o "incluye" y/o "que incluye" cuando se usan en esta memoria descriptiva, especifican la presencia de características, regiones, números enteros, etapas, operaciones, elementos y/o componentes indicados, pero no excluyen la presencia o adición de una o más características, regiones, números enteros, etapas, operaciones, elementos, componentes y/o grupos de los mismos. El término "o una combinación de los mismos" significa una combinación que incluye al menos uno de los elementos anteriores.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos (incluidos los términos técnicos y científicos) usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción. Además, se entenderá que términos tales como los definidos en diccionarios de uso común deben interpretarse como que tienen un significado que es consistente con su significado en el contexto de la técnica relevante y la presente descripción, y no se interpretarán en un sentido idealizado o demasiado formal a menos que se defina de forma expresa así en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "glioblastoma multiforme", "GBM" y "glioblastoma" se refieren a cáncer cerebral de glioma primario de grado IV.

Como se usa en el presente documento, un "sujeto" se refiere a un mamífero. Opcionalmente, un sujeto es un primate humano o no humano. Opcionalmente, un sujeto es un perro, gato, equino, oveja, bovino, conejo, cerdo o murino.

Como se usa en el presente documento, el término "secuencialmente" se refiere a un protocolo de tratamiento en el que la administración de un primer agente terapéutico va seguida de la administración de un segundo agente terapéutico.

Como se usa en el presente documento, el término "simultáneamente" se refiere a la administración de un primer agente terapéutico y la administración de un segundo agente terapéutico, donde el primer y segundo agentes terapéuticos están separados y se administran sustancialmente al mismo tiempo.

El término "excipiente farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier material farmacológicamente inactivo, fisiológicamente inerte, conocido por un experto en la técnica, que es compatible con las características físicas y químicas del agente activo particular seleccionado para su uso. Excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, polímeros, resinas, plastificantes, cargas, lubricantes, diluyentes, aglutinantes, disgregantes, disolventes, codisolventes, sistemas tampón, tensioactivos, conservantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes o pigmentos de calidad farmacéutica y agentes de viscosidad.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se define en el presente documento en relación con el tratamiento de cánceres como una cantidad que disminuirá, reducirá, inhibirá o anulará de otro modo el crecimiento de una célula cancerosa o tumor. En algunas formas de realización, el agente o agentes terapéuticos pueden administrarse regionalmente a una región o regiones afectadas particulares del cuerpo del sujeto. En algunas formas de realización, en las que dicho tratamiento se considera más adecuado, el agente o agentes terapéuticos pueden administrarse sistémicamente. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse por vía oral o parenteral. En una forma de realización específica, los agentes terapéuticos se administran por vía intravenosa.

Los términos "trata", "tratamiento" y "tratar", como se usan en el presente documento, se refieren a un método para aliviar o anular una enfermedad, trastorno y/o síntomas de los mismos en un sujeto.

SapC-DOPS se refiere a una nanovesícula estable compuesta por saposina C (SapC), una proteína lisosomal que cataboliza glicoesfingolípidos y el fosfolípido dioleoilfosfatidilserina (DOPS) (**Fig. 1A**). SapC-DOPS se describe adicionalmente en la patente de Estados Unidos número 8,937,156, expedida el 20 de enero de 2015. En una forma de realización, SapC tiene una secuencia proteica que consiste en SDVYCEVCEFLVKEVTKLIDNNKTEKEILDADFDMCSKLPKSLSEECQEVVDYTGSSILSI LLEEVSPELVCSMLHLCSSG (SEC ID NO: 1). En algunas formas de realización, SapC comprende una secuencia proteica que tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1.

AS1411 es un aptámero oligonucleotídico rico en guanina de 26 pares de bases con nucleolina, que es capaz de formar una estructura cuádruplex (**Fig. 1B**). AS1411 se describe adicionalmente en el documento WO2009/098464, publicado el 13 de agosto de 2009. En una forma de realización, AS1411 tiene una secuencia de ácido nucleico que consiste en 5'-d(GGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG)-3' (SEC ID NO: 2). En algunas formas de realización, AS1411 comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2.

La presente descripción muestra que el tratamiento conjunto de células de glioblastoma U87-MG con AS1411 y SapC-DOPS tiene efectos antiproliferativos potenciados en comparación con cualquiera de los fármacos solo. Se demuestra que AS1411 sensibiliza las células U87-MG a la SapC-DOPS aumentando los niveles de PS de superficie de una

manera dependiente del tiempo. Se demuestra además que AS1411 induce cambios morfológicos similares a la metuosis con un número aumentado de vacuolas intracelulares. Curiosamente, aunque se sabe que la apoptosis aumenta los niveles de PS de superficie, la conexión entre la metuosis y un aumento de PS de superficie no se ha establecido previamente con claridad. La presente descripción indica que la elevación de PS de superficie no es

Composiciones

La presente descripción incluye composiciones que comprenden combinaciones de SapC-DOPS y AS1411 y sus métodos de uso. En ciertas formas de realización, el AS1411 y la SapC-DOPS están formulados por separado y se administran como composiciones separadas a una célula, tumor o sujeto.

En otras formas de realización, las nanovesículas de SapC-DOPS encapsulan oligonucleótidos de AS1411 dentro de las nanovesículas. La encapsulación de AS1411 dentro de nanovesículas de SapC-DOPS proporciona ciertos beneficios. En algunas formas de realización, la SapC-DOPS facilita la administración de AS1411 a través de la barrera hematoencefálica (BBB) de un sujeto. En algunas formas de realización, la encapsulación de AS1411 dentro de las nanovesículas de SapC-DOPS permite la administración de dosis relativamente menores de AS1411 y evita problemas de toxicidad potencialmente asociados con dosis altas de AS1411.

En formas de realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden SapC-DOPS, AS1411 o SapC-DOPS que encapsulan AS1411 se formulan para administración parenteral. Las composiciones que comprenden agentes terapéuticos descritos en el presente documento adecuados para administración parenteral pueden comprender uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes incluyen soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles fisiológicamente aceptables, y polvos estériles para reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. Ejemplos de portadores, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol y similares), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes y de dispensación. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante el uso de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Métodos y composiciones para su uso en métodos de tratamiento

En una forma de realización, se proporciona una combinación de agentes terapéuticos que comprende: saposina C y dioleoilfosfatidilserina (SapC-DOPS); y aptámero de nucleolina AS1411 para su uso en un método para inducir la muerte celular en una célula cancerosa de glioblastoma multiforme, donde se induce la muerte celular de la célula cancerosa. En formas de realización, la SapC-DOPS está presente como nanovesículas. En ciertas formas de realización, AS1411 y SapC-DOPS se formulan por separado y se administran como composiciones separadas. En tales formas de realización, SapC-DOPS y AS1411 se pueden administrar de forma simultánea o secuencial. En otras formas de realización, las nanovesículas de SapC-DOPS encapsulan oligonucleótidos AS1411 dentro de las nanovesículas. En formas de realización, AS1411 aumenta los niveles de fosfatidilserina (PS) en la superficie de la membrana celular cancerosa externa, potenciando así el efecto citotóxico de SapC-DOPS en las células de glioblastoma.

En otra forma de realización, se proporciona una combinación de agentes terapéuticos que comprende: SapC-DOPS y aptámero de nucleolina AS1411 para su uso en un método de tratamiento de cáncer de glioblastoma multiforme en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar la combinación al sujeto. En otra forma de realización, se proporciona una combinación de agentes terapéuticos que comprende: SapC-DOPS y AS1411 para su uso en un método para inhibir el crecimiento de un tumor de glioblastoma multiforme en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar la combinación al sujeto, donde se inhibe el crecimiento del tumor. En formas de realización, la SapC-DOPS está presente como nanovesículas.

En ciertas formas de realización, el AS1411 y la SapC-DOPS se formulan por separado y se administran como composiciones separadas. En tales formas de realización, SapC-DOPS y AS1411 pueden administrarse simultánea o secuencialmente. En algunas formas de realización, SapC-DOPS y AS1411 se administran por separado a un sujeto por vías parenterales, tales como intravenosas.

Cuando se administra por separado, SapC-DOPS se administra a un sujeto en una dosis que varía de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 1,2 mg/kg/día. En formas de realización, AS1411 se administra a un sujeto en una dosis que varía de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 mg/kg/día. En un ciclo a modo de ejemplo de

28 días, cada uno de SapC-DOPS y AS1411 se administra diariamente durante cinco días durante la semana 1 (por ejemplo, lunes - viernes); SapC-DOPS y AS1411 se administran en días alternos durante cinco días durante la semana 2, comenzando con SapC-DOPS (por ejemplo, SapC-DOPS se administra lunes, miércoles y viernes y AS1411 se administra martes y jueves). Durante las semanas 3 y 4, SapC-DOPS y AS1411 se administran cada uno una vez a la semana, en diferentes días (por ejemplo, SapC-DOPS se administra lunes y AS1411 se administra martes).

En otras formas de realización, las nanovesículas de SapC-DOPS encapsulan oligonucleótidos AS1411 dentro de las nanovesículas. Cuando se administra una composición que comprende SapC-DOPS que encapsula AS1411, la composición se administra a un sujeto por vía parenteral, tal como intravenosa.

Una composición que comprende SapC-DOPS que encapsula AS1411 se administra a un sujeto en una dosis que varía de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 1,2 mg/kg/día. En un ciclo a modo de ejemplo de 28 días, la composición de SapC-DOPS/AS1411 se administra diariamente durante cinco días durante la semana 1 (por ejemplo, lunes - viernes); días alternos durante un total de tres administraciones durante la semana 2 (por ejemplo, lunes, miércoles y viernes); y una vez a la semana durante las semanas 3 y 4 (por ejemplo, solo lunes).

El experto en la técnica apreciará que los programas de dosificación y las cantidades expuestas en el presente documento son ejemplares y pueden variarse por el médico encargado de acuerdo con la edad y el estado físico del sujeto que va a tratarse, la gravedad de la enfermedad, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente, la combinación particular de agentes terapéuticos que se están empleando, los excipientes farmacéuticamente aceptables particulares utilizados y factores similares dentro del conocimiento y experiencia del médico encargado.

Kits

En el presente documento se proporcionan kits que comprenden las composiciones descritas para el tratamiento de glioblastoma multiforme. En disposiciones, un kit puede alojar dos recipientes, comprendiendo el primer recipiente una primera composición farmacéutica que comprende SapC-DOPS, y comprendiendo el segundo recipiente una segunda composición farmacéutica que comprende AS1411. Los kits pueden comprender además instrucciones de uso de los componentes del kit para poner en práctica los métodos descritos. Las instrucciones para poner en práctica los presentes métodos se registran generalmente en un medio de registro adecuado. Por ejemplo, las instrucciones pueden estar presentes en los kits como un prospecto o en el etiquetado del recipiente del kit o componentes del mismo. En otras disposiciones, las instrucciones están presentes como un archivo de datos de almacenamiento electrónico presente en un medio de almacenamiento legible por ordenador adecuado, tal como una unidad flash, un CD-ROM o un disquete. En otras disposiciones, las instrucciones reales no están presentes en el kit, sino que se proporcionan medios para obtener las instrucciones desde una fuente remota, tal como a través de Internet. Un ejemplo de esta disposición es un kit que incluye una dirección web en la que pueden consultarse las instrucciones y/o desde la cual pueden descargarse las instrucciones. Al igual que con las instrucciones, este medio para obtener las instrucciones está registrado en un sustrato adecuado.

Los procesos, composiciones y kits específicos que se describen en el presente documento se ilustran en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1. Determinación de efectos citotóxicos de AS1411 y SapC-DOPS

Se sembraron células U87-MG en placas de cultivo celular de 96 pocillos convencionales a una confluencia de 1500 células/pocillo. Después de 24 horas, se trataron las células con AS1411 4 μ M y SapC-DOPS 40 μ M o 50 μ M en DMEM convencional con FBS al 10% y penicilina/estreptomicina. Después de 96 horas, se añadieron 10 μ l del reactivo MTT a cada pocillo, a continuación, 4 horas después, se añadieron 100 μ l de detergente a cada pocillo. Después de 24 horas de lisis, se midió la absorbancia a 570 nm usando un lector de placas de microvaloración.

Los resultados muestran que SapC-DOPS y AS1411 presentan efectos citotóxicos combinados significativos en células de glioblastoma U87-MG (**Figuras 2A y 2B**).

Ejemplo 2. Determinación de PS de la superficie celular

Se sembraron células U87-MG en placas de cultivo celular convencionales de 60 mm a ~50% de confluencia. Después de 24 horas, se añadieron 6 μ M de AS1411 en DMEM a cada placa en los puntos temporales de 24, 48 y 72 horas. Las células se tiñeron después con anexina V-FITC usando un protocolo de tinción convencional y se evaluaron para determinar los niveles de PS de superficie usando citometría de flujo.

Los resultados muestran que AS1411 aumenta la PS de superficie en células U87-MG sin aumentar PI (**Fig. 3A, 3C**). Los histogramas muestran el aumento en la PS de superficie en células tratadas a las 72 horas (**Fig. 3B**).

Ejemplo 3. Determinación de los niveles de caspasa-3 como medida de la apoptosis

Se sembraron células U87-MG en placas de cultivo celular convencionales de 60 mm a ~50% de confluencia. Después

de 24 horas, se añadieron 15 μ M de AS1411 en DMEM y 100 μ M de temozolomida (TMZ) en DMEM a cada placa. Las células se recogieron a las 72 h y 48 h respectivamente y se analizaron usando el kit de ensayo de caspasa-3 EnzCheck de Molecular Probes utilizando el sustrato Z-DEVD-AMC (incubado durante 30 minutos). Se midió la fluorescencia (excitación/emisión: 340/440 nm) con un fluorómetro convencional.

- 5 Los resultados (**Fig. 4**) muestran que AS1411 no aumenta la actividad caspasa tanto como el fármaco apoptótico TMZ. Los resultados sugieren además que la apoptosis no es la principal vía de muerte celular desencadenada por AS1411.

Ejemplo 4. AS1411 induce vacuolización similar a metuosis en células U87-MG

- 10 Se cultivaron células U87-MG hasta una confluencia de aproximadamente el 50% en placas de cultivo celular de 6 pocillos de fondo plano convencionales. Las células se trataron después con MIPP 10 μ M (un compuesto que previamente demostró que induce metuosis) o AS1411 15 μ M durante 72 horas. Se tomaron fotos comparando los dos pocillos de tratamiento con células de control no tratadas, usando un microscopio con cámara.

Los resultados muestran que AS1411 induce cambios morfológicos incluyendo vacuolización en células U87-MG que es consistente con los efectos previamente descritos de AS1411 en otras líneas celulares tumorales (**Figuras 5A-5E**).

Ejemplo 5. Encapsulación de AS1411 en SapC-DOPS

- 15 Se preparó SapC-DOPS liofilizada en una relación de 3,6 mg de SapC a 2,3 mg de DOPS. Se obtuvo AS1411 liofilizado con tecnología de ADN integrado y se resuspendió en agua libre de nucleasas hasta una concentración madre de 1 mM. Esta concentración madre se diluyó en un volumen de 4 ml de NaCl al 0,9% hasta una concentración final de AS1411 4 μ M. Los 4 ml totales de AS1411 4 μ M en solución salina normal se usaron después para resuspender SapC-DOPS liofilizada. La suspensión de AS1411-SapC-DOPS se sometió a ultrasonidos en un sonicador de baño a 4 °C
20 durante 30 minutos. La suspensión se ultracentrifugó a continuación a 100 000 g durante 30 minutos a 4 °C. El líquido sobrenadante se separó cuidadosamente y se midió su absorbancia para garantizar que no había AS1411 residual presente en la solución. El sedimento se resuspendió en 4 ml de DMEM para obtener una concentración de solución madre final de SapC-DOPS 100 μ M con AS1411 encapsulado. Esta solución madre se diluyó después hasta las concentraciones finales de SapC-DOPS de 40 μ M o 50 μ M usadas en los experimentos de MTT.

- 25 **Ejemplo 6. Determinación de los efectos citotóxicos de AS1411 encapsulado en SapC-DOPS**

- Se sembraron células U87-MG en placas de cultivo celular de 96 pocillos convencionales a una confluencia de 1500 células/pocillo. Después de 24 horas, las células se trataron con diversas concentraciones de AS1411, SapC-DOPS y SapC-DOPS que encapsula AS1411 en DMEM convencional con FBS al 10% y penicilina/estreptomicina. Después
30 de 96 horas, se añadieron 10 μ l del reactivo MTT a cada pocillo, a continuación, 4 horas después, se añadieron 100 μ l de detergente a cada pocillo. Después de 24 horas de lisis, se midió la absorbancia a 570 nm usando un lector de placas de microvaloración.

- Los resultados muestran que SapC-DOPS 40 μ M (**Fig. 6A**) o SapC-DOPS 50 μ M (**Fig. 6B**) con AS1411 4 μ M encapsulado presentan efectos citotóxicos combinados significativos en células de glioblastoma U87-MG. Adicionalmente, los resultados muestran que el tratamiento de combinación con AS1411 y SapC-DOPS o la
35 encapsulación de AS1411 en SapC-DOPS tiene efectos citotóxicos similares (**Fig. 7A y 7B**).

Las patentes, solicitudes y publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas de los niveles de los expertos en la técnica a la que pertenece la invención.

La descripción anterior es ilustrativa de formas de realización particulares de la invención. Las siguientes reivindicaciones definen el ámbito de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de agentes terapéuticos que comprende:
saposina C y dioleoilfosfatidilserina (SapC-DOPS); y
aptámero de nucleolina AS1411,
5 para su uso en un método de inducción de muerte celular en una célula cancerosa multiforme de glioblastoma, donde se induce la muerte celular de la célula cancerosa.
2. La combinación de agentes terapéuticos para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde SapC-DOPS está presente como nanovesículas; opcionalmente donde AS1411 se encapsula dentro de las nanovesículas de SapC-DOPS.
3. La combinación de agentes terapéuticos para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde SapC-DOPS se administra de manera simultánea o secuencial con AS1411.
10 4. La combinación de agentes terapéuticos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde AS1411 aumenta los niveles de fosfatidilserina en la superficie de la membrana celular cancerosa externa.
5. La combinación de agentes terapéuticos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde
15 i) AS1411 y SapC-DOPS se formulan por separado y se administran como composiciones separadas; o
ii) AS1411 se encapsula dentro de nanovesículas de SapC-DOPS.
6. Una combinación de agentes terapéuticos que comprende:
saposina C y dioleoilfosfatidilserina (SapC-DOPS); y
aptámero de nucleolina AS1411,
20 para su uso en un método de tratamiento de cáncer de glioblastoma multiforme en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar la combinación al sujeto.
7. La combinación de agentes terapéuticos para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde SapC-DOPS está presente como nanovesículas; opcionalmente donde AS1411 se encapsula dentro de las nanovesículas de SapC-DOPS.
8. La combinación de agentes terapéuticos para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, donde SapC-DOPS se administra de manera simultánea o secuencial con AS1411.
25 9. La combinación de agentes terapéuticos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde administrar la combinación de agentes terapéuticos comprende una vía intravenosa.
10. La combinación de agentes terapéuticos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, donde AS1411 aumenta los niveles de fosfatidilserina en la superficie de la membrana celular cancerosa externa.
30 11. La combinación de agentes terapéuticos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, donde se inhibe el crecimiento de un tumor de glioblastoma multiforme.
12. La combinación de agentes terapéuticos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, donde:
i) AS1411 y SapC-DOPS se formulan por separado y se administran como composiciones separadas; o
ii) AS1411 se encapsula en nanovesículas de SapC-DOPS.
35 13. Una composición farmacéutica que comprende:
saposina C y dioleoilfosfatidilserina (SapC-DOPS), donde SapC-DOPS está presente como nanovesículas; y
aptámero de nucleolina AS1411, donde AS1411 se encapsula dentro de las nanovesículas de SapC-DOPS; y
un excipiente farmacéuticamente aceptable.
40 14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, donde la composición se formula para administración intravenosa.

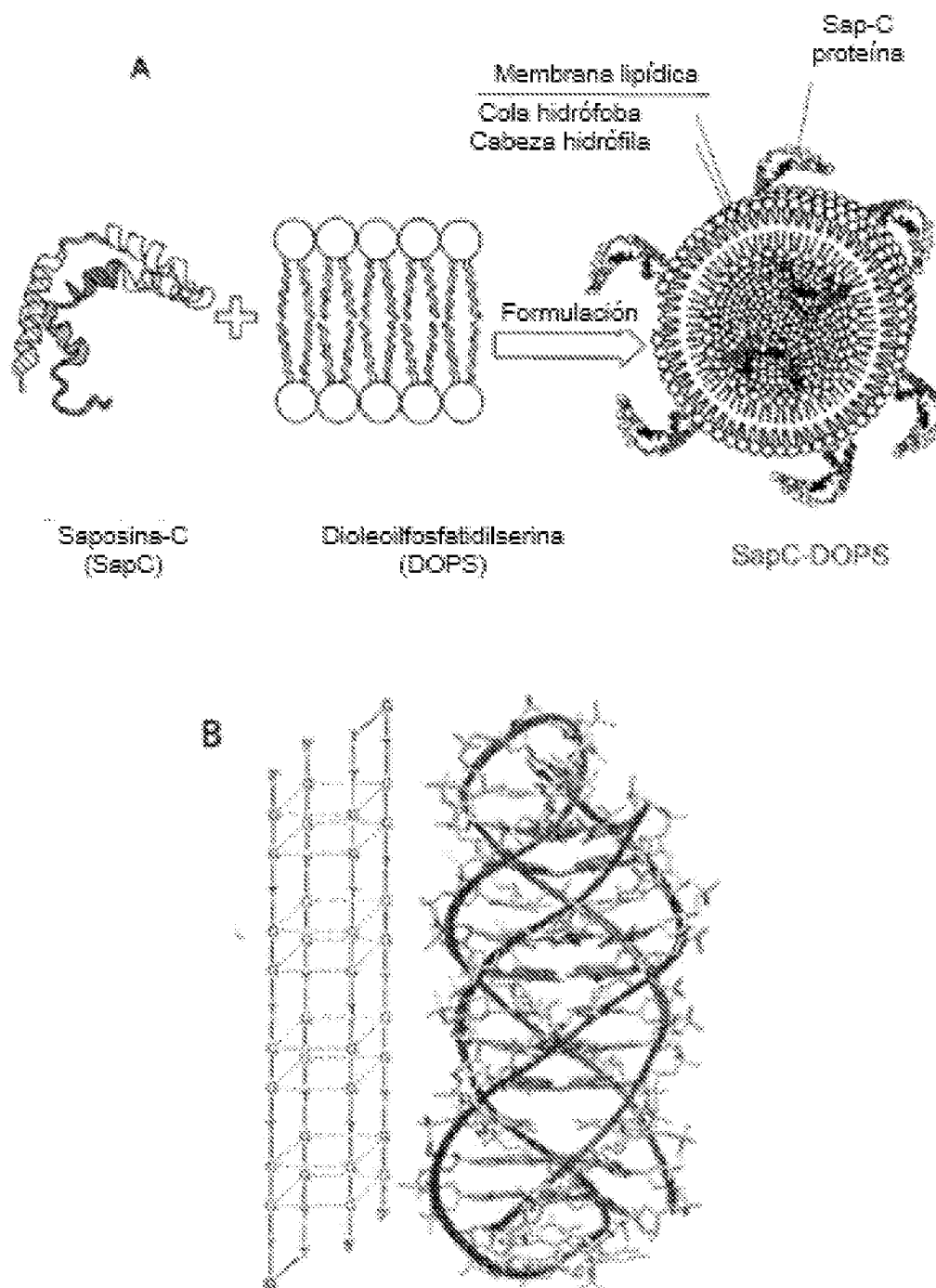
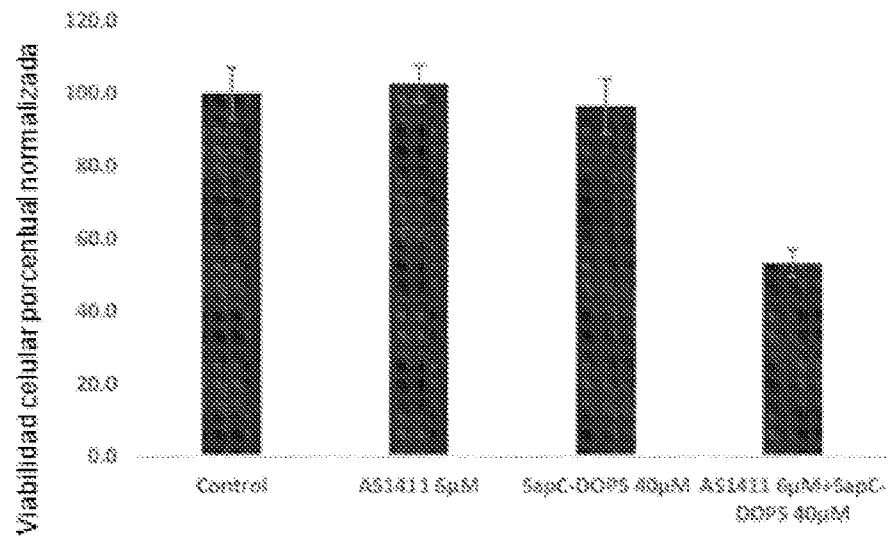


Figura 1

A



B

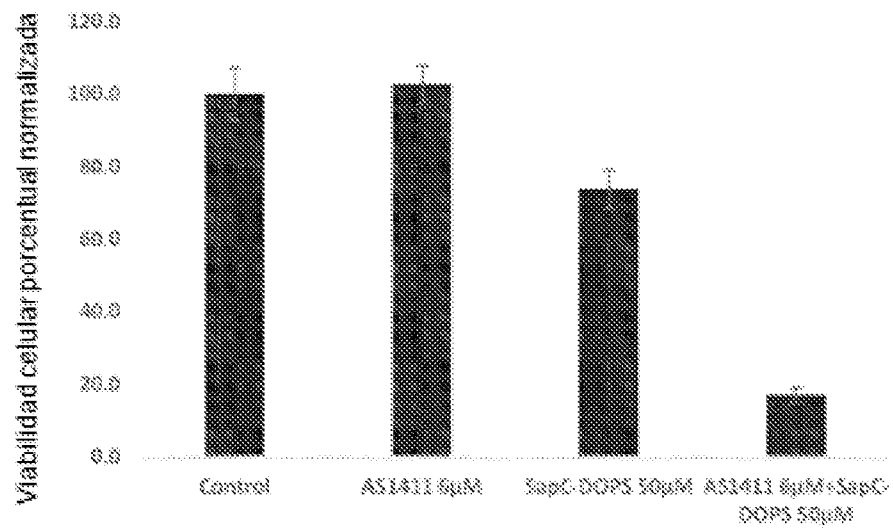


Figura 2

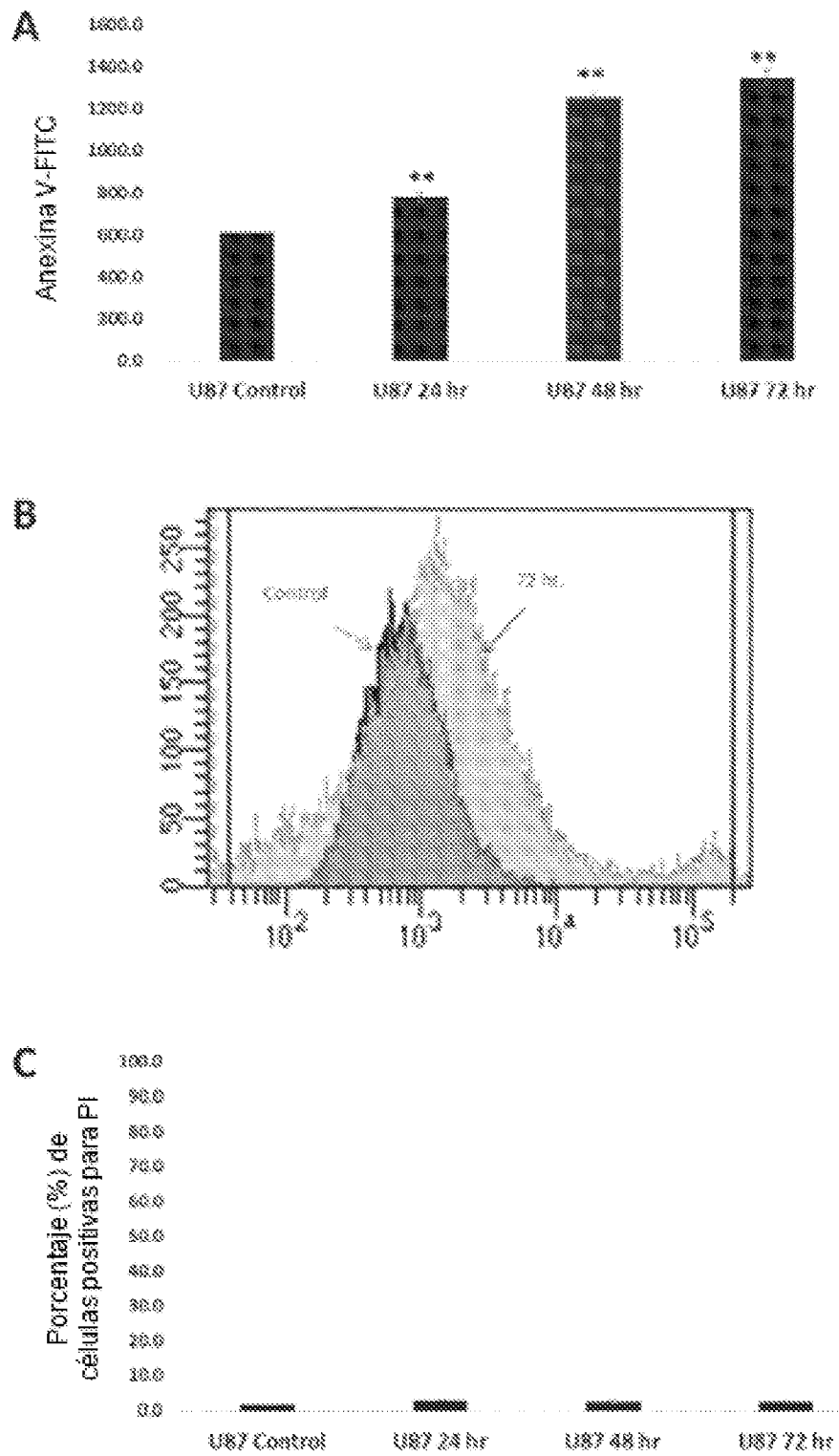


Figura 3

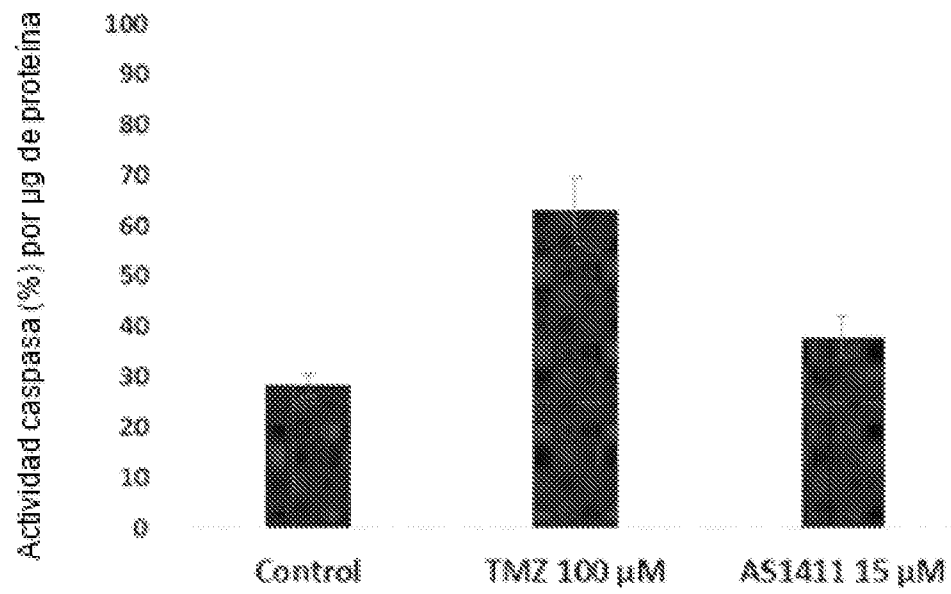
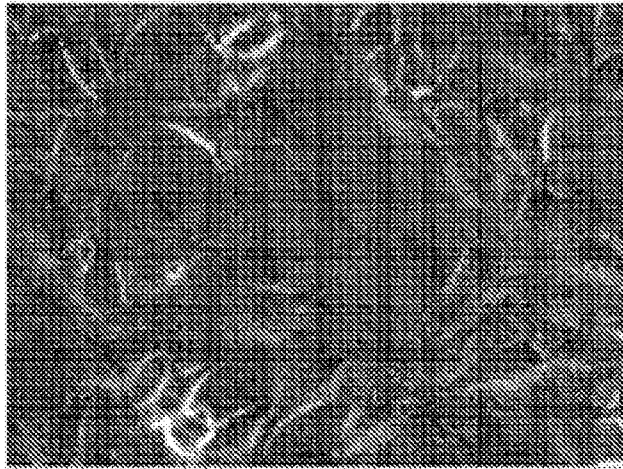
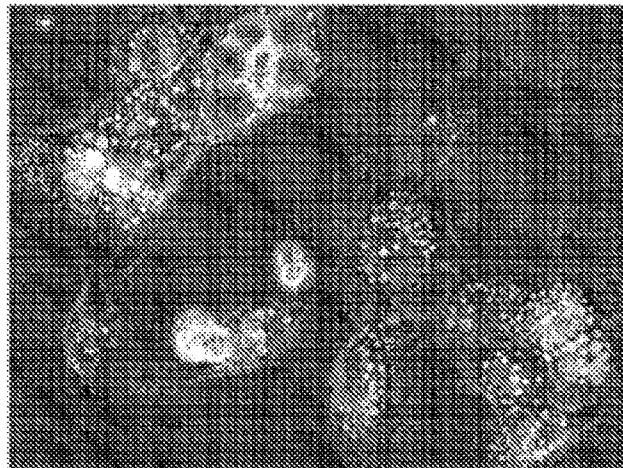


Figura 4

A



B



C

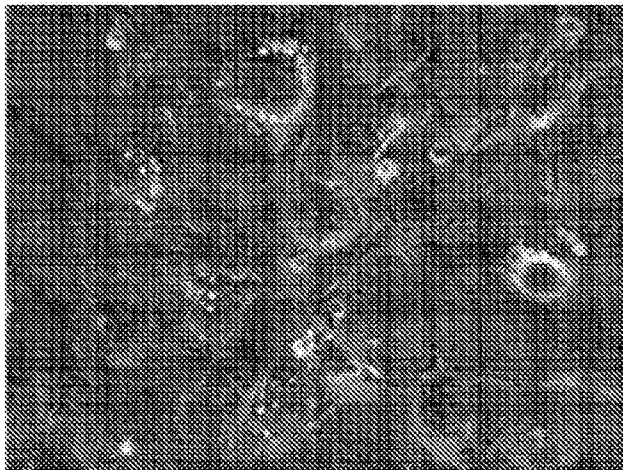
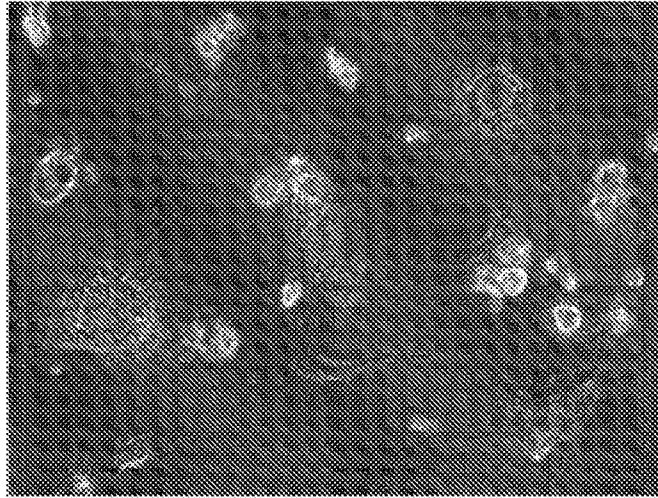


Figura 5

D



E

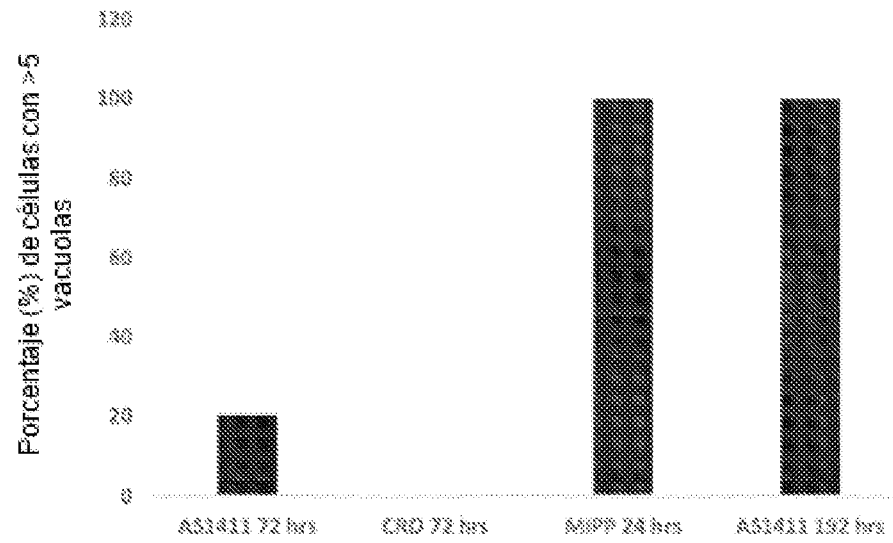


Figura 5

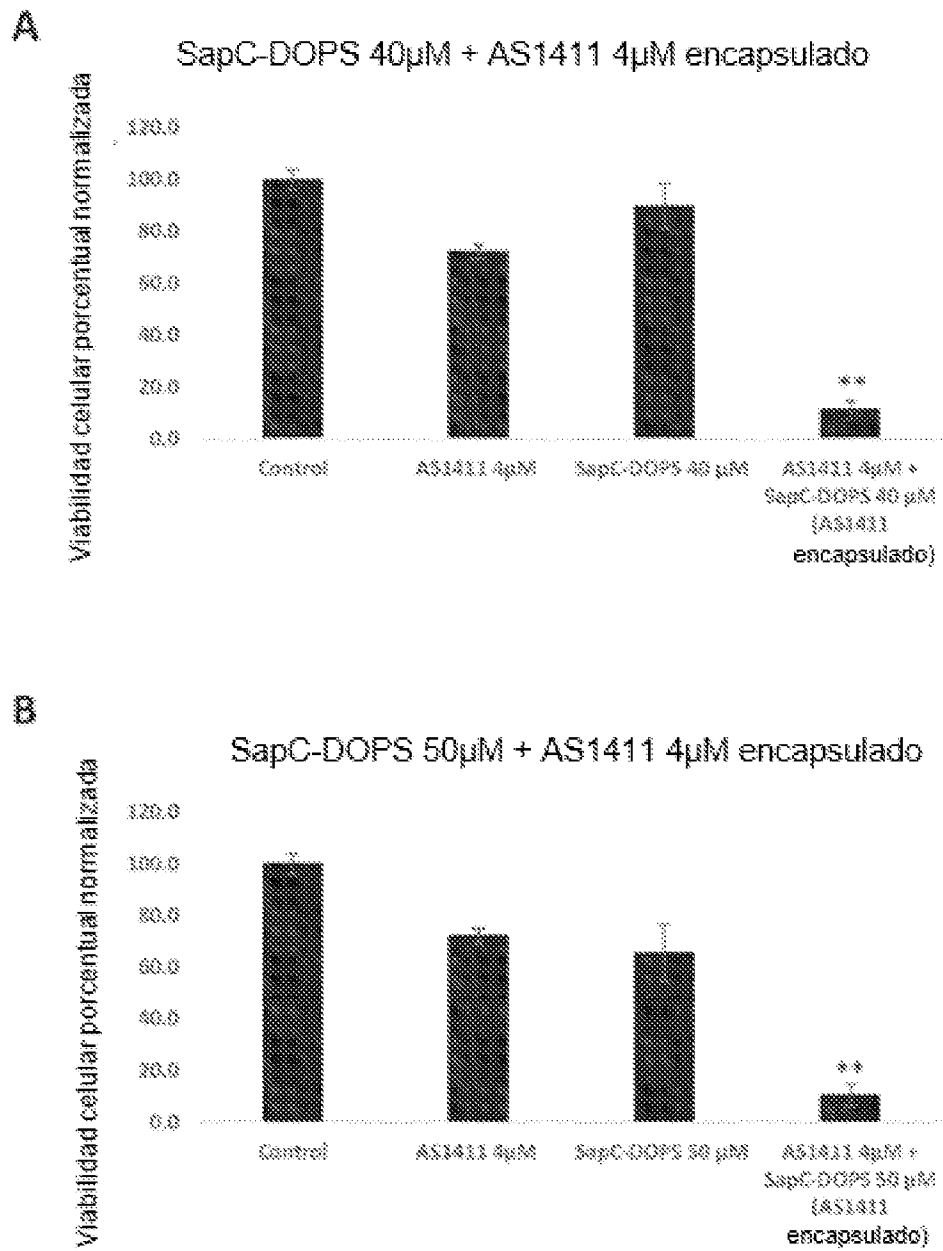
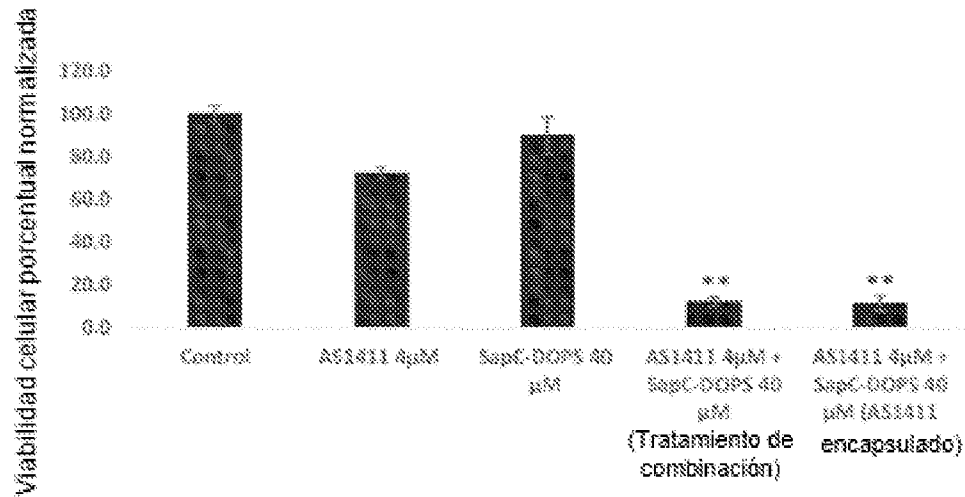


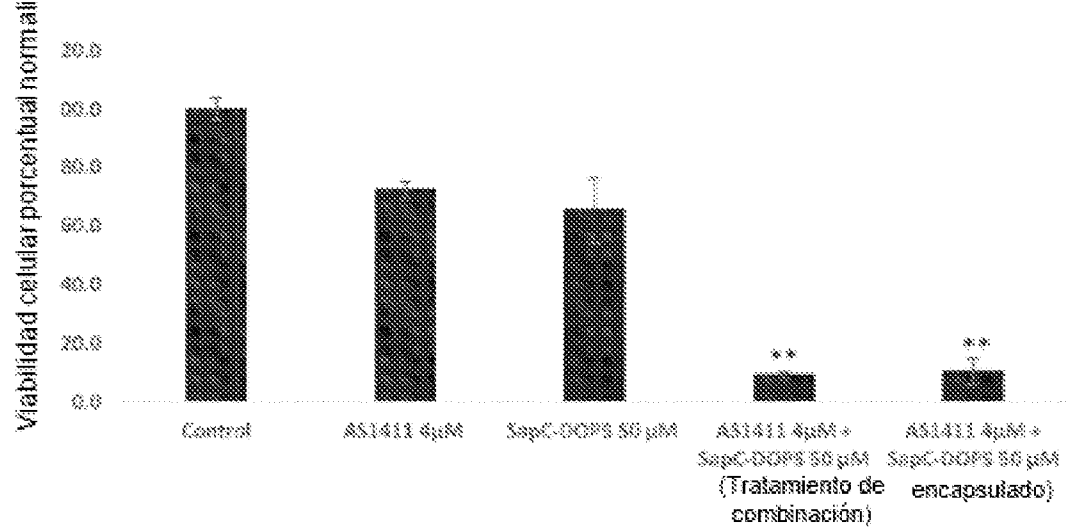
Figura 6

A

Comparación de tratamiento de combinación y encapsulación de
AS1411 4 μ M + SapC-DOPS 40 μ M

**B**

Comparación de tratamiento de combinación y encapsulación de AS1411
4 μ M + SapC-DOPS 50 μ M

**Figura 7**