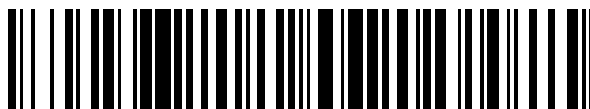


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 832 802**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)
A61K 47/30 (2006.01)
A61K 47/42 (2007.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 47/50 (2007.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/335 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 23/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2015** **PCT/US2015/061853**
87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2016** **WO16081835**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2015** **E 15860689 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2020** **EP 3220900**

54 Título: **Sistemas de administración dirigida del particulado específico de una estructura**

30 Prioridad:

21.11.2014 US 201462083011 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.06.2021

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF MARYLAND, BALTIMORE (50.0%)
620 West Lexington Street, 4th Floor
Baltimore, MD 21201, US y
THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:

WOODWORTH, GRAEME F.;
WINKLES, JEFFREY A.;
KIM, ANTHONY J.;
SCHNEIDER, CRAIG S. y
HANES, JUSTIN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 832 802 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

Sistemas de administración dirigida del particulado específico de una estructura

5 Referencia a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional 62/083.011, presentada el 21 de noviembre de 2014.

10 DECLARACIÓN DEL INTERÉS GUBERNAMENTAL

La presente invención se realizó con apoyo gubernamental en virtud de las subvenciones número NS080223, CA164789, CA151838, EB018370 y NS090430 otorgadas por los National Institutes of Health. El gobierno posee ciertos derechos sobre la invención.

Antecedentes

Una amplia gama de cánceres que incluyen glioblastoma (GBM), melanoma, mama, próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas y otros, sobreexpresan el factor de crecimiento de fibroblastos 14 inducible ("Fn14"). De interés específico es el GBM. Esta es la forma más común de cáncer de cerebro primario y se cobra más de 15.000 vidas en los EE.UU. cada año, a menudo con consecuencias neurológicas devastadoras. El GBM no es curable con cirugía sola porque las células tumorales invaden el cerebro circundante, lo que hace que la resección completa sea insegura. Las terapias adyuvantes actuales utilizan radiación de haz externo fraccionada combinada con el agente quimioterapéutico Temodar® administrado por vía oral. A pesar de estos tratamientos, la supervivencia media sigue siendo inferior a 18 meses. Se cree que una limitación importante es la administración de agentes terapéuticos a las células cancerosas invasoras, que a menudo se encuentran a muchos centímetros de la masa tumoral principal dentro del tejido cerebral funcional. Enfoques de tratamiento novedosos tales como Gliadel®, una oblea polimérica biodegradable cargada con quimioterapia que se implanta en el cerebro después de la resección del tumor, solo proporciona una mejora modesta en el tiempo medio de supervivencia debido en parte a la penetración limitada del fármaco en el tejido cerebral circundante.

La ubicación de las células tumorales invasoras presenta varias barreras para la administración terapéutica. La barrera hematoencefálica (BHE) regula el tráfico de moléculas hacia y desde el cerebro. Las células tumorales irresecables se encuentran constantemente en regiones del cerebro con vasos sanguíneos relativamente sanos. Potencialmente, los agentes terapéuticos pueden administrarse al cerebro mediante el transporte mediado por receptores a través de la BHE, la interrupción mecánica de la BHE a través de ultrasonido focalizado, o usando agentes hiperosmóticos; sin embargo, todavía no está claro si se pueden alcanzar con seguridad dosis terapéuticas suficientes. Los enfoques de administración local, tal como Gliadel®, oblea o administración mejorada por convección (CED), evitan las complejidades asociadas con la BHE, administrando terapias de manera más directa y profunda en el tejido cerebral. La seguridad y viabilidad de estos enfoques en estudios clínicos en seres humanos se ha demostrado repetidamente, sin embargo, la penetración de sustancias a menudo sigue siendo limitada. Esto se debe en gran parte al espacio extracelular anisotrópico y cargado electrostáticamente (ECS) que se encuentra entre las células cerebrales, que comprende el 15-20 % del volumen total del cerebro, que actúa como una "barrera de penetración cerebral" (BPB). La matriz extracelular (ECM) circundante y las células cerebrales actúan como sumideros de fármacos de molécula pequeña, proteínas, partículas virales y nanopartículas estándar, limitando así su difusión y distribución por todo el cerebro y los resultados terapéuticos eficaces. Además, los canales perivasculares sirven como mecanismos de depuración cerebral críticos y eficientes para moléculas pequeñas y sistemas de administración de particulado, lo que limita aún más la distribución, el tiempo de residencia y la eficacia de los agentes terapéuticos.

Las terapias dirigidas ofrecen el potencial de administrar terapias directamente a las células de cáncer de cerebro invasivas para mejorar los efectos del tratamiento deseados mientras se minimiza la toxicidad no deseada. Los estudios anteriores que exploraron este enfoque para el cáncer de cerebro invasivo incluyeron el direccionamiento a moléculas de la superficie celular tumoral y componentes de la ECM asociados a tumor. Sin embargo, la mayoría de las formulaciones terapéuticas dirigidas aún tienen que mostrar mejoras en la progresión o supervivencia de la enfermedad.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar un tratamiento para un trastorno o enfermedad del cerebro, tal como GBM, que pueda administrar agentes terapéuticos a las células tumorales invasoras fuera de un área que sea segura para la extirpación quirúrgica. La presente invención satisface esa necesidad al proporcionar un sistema de administración dirigida de particulado específico de estructura que tiene (i) una partícula, (ii) un revestimiento de superficie de PEG denso, (iii) un resto de direccionamiento conjugado en la superficie de la partícula, tal como un anticuerpo monoclonal ITEM 4 (anticuerpo monoclonal) que reconoce el receptor de la superficie celular Fn14 en una célula tumoral de interés, y (iv) un agente biológicamente activo tal como agentes terapéuticos (agentes anticancerosos), agentes de diagnóstico (por ejemplo, agentes de contraste; radionúclidos; y restos fluorescentes, luminiscentes y magnéticos), agentes profilácticos (por ejemplo, vacunas), agentes nutracéuticos (por ejemplo, vitaminas, minerales, etc.), ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN y ARN), y agentes de formación de imágenes (por

ejemplo, a través de imágenes de resonancia magnética, imágenes ópticas, tomografía por emisión de positrones, tomografía computarizada de rayos X, e imágenes por ultrasonido). Este sistema de administración de particulado puede dirigirse a estructuras específicas de la enfermedad con una unión no específica minimizada dentro del microambiente y/o la circulación y una unión muy específica a las estructuras específicas de la enfermedad.

- 5 Nance, E et al (Sci Trans 1 Med., acceso público en los NIH, vol. 4, n.º 149, 2012) divulgan nanopartículas cargadas con fármaco recubiertas de polietilenglicol para el tratamiento de tumores. Hong Zhou et al, (Mol. Cancer Ther., vol.10, n.º 7, julio de 2011, págs. 1276-1288) enseñan el desarrollo y caracterización de inmunoconjugados diseñados para dirigirse al receptor Fn14 en células de tumor sólido.

10 Sumario

Se ha descubierto que las células tumorales (es decir, células de glioblastoma) y las células enfermas del cerebro debido a enfermedades neurodegenerativas o trastornos neurológicos (es decir, enfermedad de Alzheimer ("EA"), enfermedad de Parkinson ("EP") o enfermedad de Huntington ("EH")) y en otras partes del cuerpo se pueden dirigir específicamente mediante el uso de un sistema de administración de particulado que se carga con agentes biológicamente activos. La presente invención se define con referencia a las reivindicaciones adjuntas. Otras afecciones adecuadas para efectos dirigidos incluyen, pero sin limitación, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de mama, meduloblastoma, lesión por radiación y enfermedades inflamatorias. El sistema de administración de particulado puede unirse a una diana en la célula tumoral o región específica de la enfermedad. Específicamente, la unión puede producirse usando un agente biológicamente activo tal como un anticuerpo monoclonal Fn14 que es específico para la proteína Fn14 en la superficie celular de una célula cancerosa positiva para Fn14 (es decir, una célula de glioblastoma) en pacientes con cáncer. Estas partículas decoradas con anticuerpos monoclonales Fn14 están diseñadas y genomanipuladas para penetrar en el tejido cerebral y unirse selectivamente a Fn14 pero no al microentorno cerebral y/o tumoral, tal como las proteínas de la ECM cerebral. Minimizar la unión no específica y las restricciones estéricas relacionadas con el tamaño de las partículas dirigidas en el cerebro puede mejorar en gran medida el acceso de los sistemas de administración de particulado a las células tumorales cerebrales remotas y otras diana cerebrales.

La presente invención se refiere a un sistema de administración dirigida basado en particulado específico de estructura que comprende una nanopartícula que tiene un diámetro de 120 nm, 130 nm, 140 nm, 150 nm, 160 nm, 170 nm, 180 nm o 190 nm. La nanopartícula está recubierta con un polímero de polietilenglicol (PEG) para lograr una densidad superficial de al menos 0,1 moléculas de PEG por nm² y configurado para penetrar en el tejido cerebral y/o tumoral permitiendo así una mejor distribución dentro del tejido cerebral. Los restos de direccionamiento, tal como el anticuerpo monoclonal Fn14 ITEM4, o versiones modificadas, tal como ITEM4-SH, se conjugan sobre una superficie de la nanopartícula y se configuran para promover la unión específica a una molécula de la superficie celular tal como la proteína Fn14 expresada por la célula diana (es decir, una célula tumoral tal como una célula de glioblastoma). La nanopartícula comprende además un agente terapéutico (agente anticanceroso), en o sobre la nanopartícula. El agente terapéuticamente activo se selecciona para potenciar una respuesta deseada en la célula diana de forma intracelular o extracelular o en la región.

En otras realizaciones, se proporcionan sistemas de administración dirigida basados en particulado específicos de estructura para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno del cerebro (por ejemplo, un tumor tal como glioblastoma, trastorno neurológico, enfermedad neurodegenerativa, lesión cerebral, o traumatismo), pulmón o mama administrando a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de la formulación terapéutica particulada optimizada, ya sea local o sistémicamente.

En determinadas realizaciones o enseñanzas, se proporcionan composiciones farmacéuticas y kits que las incluyen. La composición farmacéutica puede comprender una nanopartícula como se ha descrito anteriormente y un excipiente farmacéuticamente aceptable para la administración. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además agentes de formación de imágenes a través de imágenes por resonancia magnética, imágenes ópticas, tomografía por emisión de positrones, tomografía computarizada de rayos X, e imágenes por ultrasonidos. Puede administrarse al cerebro mediante enfoques directos (es decir, inyección estereotáxica, administración mejorada por convección), enfoques sistémicos (es decir, intravenosa, intraarterial, intratecal y otras).

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor con respecto a la siguiente descripción, las reivindicaciones adjuntas y las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente determinadas realizaciones de la presente invención. La invención puede entenderse mejor haciendo referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

La figura 1 es una fotografía que muestra la formación de imágenes *in vivo* de nanopartículas no recubiertas (UCN) y movimiento de nanopartículas que penetran en el cerebro (BPN) en el cerebro del ratón, de acuerdo con una

realización;

la figura 2A es una fotografía que ilustra el enfoque utilizado para generar los datos en la figura 2B, que muestra que la expresión de ARNm de Fn14 es mayor en células de glioma activamente invasoras en comparación con las células centrales estacionarias, de acuerdo con una realización;

las figuras 3A-3D son gráficos que ilustran (A) un análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) que mide la unión del anticuerpo monoclonal Fn14 ITEM4, NP de poliestireno no recubiertas y BPN con densidades de superficie variables de ITEM4 al receptor Fn14, (B) un análisis de SPR que mide la unión de NP de poliestireno no recubiertas y BPN con densidades de superficie variables de ITEM4 a ECM de cerebro de ratón, (C) células de glioma U87 humano tratadas con BPN fluorescentes no dirigidas o BPN con densidades de superficie variables de ITEM4 y analizadas por citometría de flujo; y (D) se determinaron las trayectorias de partículas individuales en tejido de cerebro de roedor fresco usando un ensayo de seguimiento de partículas múltiples (MPT) y microscopía de alta resolución, de acuerdo con una realización;

las figuras 4A-4B son fotografías que ilustran el modelo Fn14 + GBM44 PDX en las que (A) la tinción inmunohistoquímica para Fn14 tiene lugar en tumores PDX, GBM44 (Fn14+) pero no GBM5 (Fn14-), (B) sección coronal del cerebro del tumor GBM44 con vista ampliada de la borde invasivo que muestra células de GBM humanas invasoras. La figura 4C es un gráfico que muestra la modesta eficacia de TMZ en el modelo GBM44 PDX, de acuerdo con una realización;

las figuras 5A-5B son gráficos que ilustran el análisis de la expresión de ARNm de Fn14 en tumores gliales humanos. (A) Los niveles de expresión de ARNm de Fn14 en 184 especímenes de tumores normales y cerebrales y (B) los valores de expresión de ARNm de Fn14 se analizaron en dos grupos de supervivencia de pacientes, de acuerdo con una realización;

las figuras 6A-6C son fotografías y un gráfico que ilustra los sistemas de administración basados en nanopartículas que comprenden nanovectores poliméricos que modulan el glioma de ratón. (A) Los nanovectores entran de manera eficiente en las células de glioma de ratón (GL261). (B) Después de entrar en las células, los nanovectores entregan eficazmente una construcción génica de plásmido con ARN inhibidor e indicador verde fluorescente para luciferasa (shLuc) a las células GL261 que expresan constitutivamente luciferasa. (C) Imágenes bioluminiscentes (BLI) de células GL261L *in vivo* que muestran una disminución en la señal BLI con el tiempo en animales tratados con nanovectores portadores del plásmido shLuc, de acuerdo con una realización;

la figura 7 es una imagen de transferencia de Western que ilustra la expresión de Fn14 en varias líneas celulares GBM, de acuerdo con una realización;

las figuras 8A-8D son fotografías que ilustran vectores de genes BPN que muestran una distribución cerebral *in vivo* similar a la del modelo BPN optimizado. (A) Las nanopartículas no recubiertas convencionales inyectadas directamente en el cerebro de un ratón vivo muestran una difusión o transporte mínimos. (B) El modelo BPN optimizado se distribuye rápidamente dentro del cerebro del ratón. (C) Los vectores génicos BPN también penetran bien en el tejido cerebral. (D) La superposición del modelo BPN y los vectores génicos BPN muestra una estrecha superposición de los dos tipos de partículas, de acuerdo con una realización;

la figura 9 son fotografías que ilustran el ensayo de invasión de cortes de cerebro que presenta células de glioma humano marcadas con proteína verde fluorescente ("GFP") después de 1 hora, 24 horas, y 48 horas de incubación, de acuerdo con una realización;

las figuras 10A-10B son gráficos que muestran las condiciones de reacción para la optimización de (A) la modificación con tiol de ITEM4 y (B) la densidad superficial de ITEM4 para nanopartículas recubiertas ("CNP") - nanopartículas ITEM4, de acuerdo con una realización;

las figuras 11A-11B son gráficos que ilustran el análisis SPR que mide el anticuerpo ITEM4 y la unión de nanopartículas al dominio extracelular de Fn14 (A) ITEM 4 libre y ITEM4 modificado con tiol (ITEM4-SH) y (B) nanopartículas CNP y CNP-ITEM4 con dos densidades superficiales diferentes de ITEM4, de acuerdo con una realización;

las figuras 12A-12B son gráficos que ilustran la especificidad de la unión de CNP-ITEM4 (alta) al chip Fn14 Biacore. La SPR que muestra (A) el bloqueo de los sitios de unión a Fn14 disponibles con exceso de ITEM4 (500 nM), (B) la unión de CNP-ITEM4 (alta) a chips Fn14 Biacore pretratados con exceso de control de isotipo de IgG (500 nM) o ITEM4 (500 nM), de acuerdo con una realización;

las figuras 13A-13C son gráficos que ilustran el análisis SPR de la unión de ITEM4 a Fn14 de acuerdo con una realización;

las figuras 14A-14B son gráficos que ilustran el análisis SPR de la unión de nanopartículas CNP-ITEM4 a Fn14,

de acuerdo con una realización;

las figuras 15A-15B son gráficos que ilustran el análisis SPR que mide la unión de (A) nanopartículas no recubiertas (UNP), CNP, CNP-ITEM4 (baja) y CNP-ITEM4 (alta) al chip ECM de cerebro de ratón. (B) Vista ampliada de la región en recuadro en A, de acuerdo con una realización;

las figuras 16A-16C son (A) una imagen de transferencia de Western y (B) datos de FACS que muestran la expresión de Fn14 en líneas celulares de fibroblastos embrionarios murinos ("MEF") negativos para Fn14 e infectados con lentivirus Fn14 (V5) y (C) un gráfico que ilustra la captación de nanopartículas MEF positivos para Fn14 y negativos para Fn14, de acuerdo con una realización;

las figuras 17A-17G son gráficos y fotografías que ilustran (A) el análisis FACS de la expresión de Fn14 en células U87 GBM, (B-G) el análisis de la captación de CNP, CNP-ITEM4 (baja) y CNP-ITEM4 (alta) en células U87 GBM positivas para Fn14, de acuerdo con una realización;

las figuras 18A-18C son imágenes y gráficos que ilustran el transporte de nanopartículas no recubiertas (UNP), CNP, CNP-ITEM4 (baja) y CNP-ITEM4 (alta) en cortes de cerebro de rata medidos mediante análisis MPT, de acuerdo con una realización;

la figura 19 es un gráfico que ilustra el análisis MPT de nanopartículas no recubiertas (UNP), CNP, CNP-ITEM4 (baja) y CNP-ITEM4 (alta) en cortes de cerebro de rata, de acuerdo con una realización;

las figuras 20A-20B son fotografías que ilustran (A) la señal BLI de un ratón portador de un tumor de glioma de luciferasa U87 intracraneal y (B) una imagen de microscopía fluorescente de tumores U87 que expresan GFP, de acuerdo con una realización;

las figuras 21A-21D son fotografías que ilustran la distribución *in vivo* de (A) CNP no dirigidas, (B) nanopartículas CNP-ITEM4, (C) células U87 que expresan GFP y (D) una imagen combinada de B y C 24 horas después de la inyección intracraneal de partículas en las coordenadas estereotaxicas similares a las de la implantación del tumor de células U87-Luc/GFP, de acuerdo con una realización.

las figuras 22A-22C son fotografías que ilustran (A) imágenes BLI de un ratón portador de un tumor de células de cáncer de mama Fn14+ y Fn14-MDA-MB-231, (B-C) imágenes BLI de órganos y tumores extraídos de ratones portadores de tumor inyectados a través de la vena de la cola con CNP no dirigidas (B) o nanopartículas CNP-ITEM4 (C), de acuerdo con una realización;

En el Sumario anterior, en la Descripción detallada, y en las reivindicaciones a continuación, así como en las figuras adjuntas, se hace referencia a características particulares de la invención. Debe entenderse que la divulgación de la invención en esta memoria descriptiva incluye todas las combinaciones posibles de dichas características particulares.

Descripción detallada

En la siguiente descripción, con fines explicativos, se exponen numerosos detalles específicos con el fin de proporcionar una comprensión profunda de la presente invención. Será evidente, sin embargo, para un experto en la técnica que la presente invención se puede poner en práctica sin estos detalles específicos.

Se ha descubierto ahora que los sistemas de administración dirigida basados en particulado específicos de estructura que incluyen una nanopartícula de tamaño específico se pueden usar para el tratamiento de trastornos y enfermedades del cerebro, pulmón y mama. Específicamente, el sistema de administración a base de nanopartículas puede difundirse y penetrar dentro del tejido cerebral y dirigirse selectivamente a tumores GBM experimentales remotos. El direccionamiento específico del tumor de nanopartículas se puede lograr mediante un equilibrio de unión no específica mínima y unión específica a células de glioma distantes. Este enfoque puede mejorar la eficacia de los fármacos al tiempo que limita muchos de los efectos secundarios y riesgos de los fármacos libres y las terapias no dirigidas.

Para que la invención pueda entenderse fácilmente y ponerse en práctica, ahora se describirán realizaciones preferidas particulares mediante los siguientes ejemplos.

1. Definiciones

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención. A continuación se describen los métodos y materiales preferidos.

Generalmente, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética, química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación descritas en el presente documento se conocen bien y se usan comúnmente en la técnica. Los métodos y las técnicas de la presente invención

se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario. [1]-[4]. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un experto en la técnica.

El término "administrar", como se usa en el presente documento, significa que un sistema de administración dirigida de particulado específico de estructura puede administrarse o realizarse usando cualquiera de los diversos métodos o para administrar un agente biológicamente activo.

Como se usa en el presente documento, el término "anfílico" se refiere a una propiedad en la que una molécula tiene tanto una parte polar como una parte no polar. A menudo, un compuesto anfílico tiene una cabeza polar unida a una larga cola hidrófoba.

El término "agente biológicamente activo" puede incluir, por ejemplo, agentes terapéuticos (agentes anticancerosos), agentes de diagnóstico (por ejemplo, agentes de contraste; radionúclidos; y restos fluorescentes, luminiscentes y magnéticos), agentes profilácticos (por ejemplo, vacunas), agentes nutracéuticos (por ejemplo, vitaminas, minerales, etc.), ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN y ARN), y agentes de formación de imágenes (por ejemplo, a través de imágenes de resonancia magnética, imágenes ópticas, tomografía por emisión de positrones, tomografía computarizada de rayos X e imágenes por ultrasonido) pueden administrarse por las nanopartículas descritas. Los agentes ilustrativos a administrar de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, fármacos, moléculas pequeñas (por ejemplo, agentes citotóxicos), ácidos nucleicos (por ejemplo, agentes de ARNip, ARNi y microARN), proteínas (por ejemplo, anticuerpos), péptidos, lípidos, hidratos de carbono, hormonas, metales, elementos y compuestos radiactivos, vacunas, agentes inmunológicos, etc., y/o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el agente a administrar es un agente útil en el tratamiento del cáncer (por ejemplo, cáncer de cerebro, específicamente glioblastoma).

El término "unir" o "unión", como se usan en el presente documento, se refieren a la interacción entre un par de moléculas correspondiente o porciones de las mismas que exhiben afinidad mutua o capacidad de unión, normalmente debido a una unión o interacción específica o no específica, incluyendo, pero sin limitación, interacciones bioquímicas, fisiológicas y/o químicas. La "unión biológica" define un tipo de interacción que se produce entre pares de moléculas que incluyen proteínas, ácidos nucleicos, glucoproteínas, hidratos de carbono, hormonas, o similares. El término "compañero de unión" se refiere a una molécula que puede experimentar unión a una molécula en particular. "Unión específica" se refiere a moléculas, tales como polinucleótidos, que son capaces de unirse o reconocer a un compañero de unión (o un número limitado de compañeros de unión) en un grado sustancialmente mayor que a otras entidades biológicas similares.

El término "biodegradable", como se usa en el presente documento, significa que los materiales se degradan o se descomponen en sus subunidades componentes, o digestión, por ejemplo, mediante un proceso bioquímico, del material en subunidades más pequeñas (por ejemplo, no poliméricas).

El término "cáncer" incluye cánceres tanto premalignos como malignos. Los cánceres incluyen, pero sin limitación, cáncer de cerebro o del sistema nervioso central, próstata, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de piel, por ejemplo, melanomas o carcinomas de células basales, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de bronquios, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga urinaria, cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer de esófago, cáncer de la cavidad oral o la faringe, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de testículos, cáncer de las vías biliares, cáncer de intestino delgado o de apéndice, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, osteosarcoma, condrosarcoma, cáncer de tejidos hematológicos, y similares. Las "células cancerosas" pueden tener la forma de un tumor, existir solas dentro de un sujeto, o ser líneas celulares derivadas de un cáncer. El cáncer puede asociarse a diversos síntomas físicos.

El término "CD266" o "TWEAK R (TNFRSF12A)", como se usa en el presente documento, también se conoce como Fn14 (factor de crecimiento de fibroblastos 14 inducible) y es un receptor para CD255/TWEAK/TNFRSF12, el inductor débil de tipo TNF de la apoptosis. CD266 se expresa en células endoteliales, así como en muchos tejidos cancerosos, y desempeña un papel en la migración, proliferación y angiogénesis de células endoteliales inducidas por CD255, así como en el crecimiento, migración e invasión de células cancerosas inducidas por CD255. La interacción CD255-CD266, o la activación de CD266 mediada por anticuerpos, también puede inducir apoptosis y necrosis en determinadas células positivas para CD266 (incluidas algunas células tumorales), que podrían tener potencial terapéutico.

El término "liberación controlada" (y variantes de ese término), como se usa en el presente documento (por ejemplo, en el contexto de "sistema de liberación controlada") generalmente pretende incluir la liberación de una sustancia (por ejemplo, un fármaco) en un sitio seleccionado o controlable de otra manera en velocidad, intervalo y/o cantidad. La liberación controlada incluye, pero no se limita necesariamente a, administración sustancialmente continua, administración con patrón (por ejemplo, administración intermitente durante un periodo de tiempo interrumpido por intervalos de tiempo regulares o irregulares), y administración de un bolo de una sustancia seleccionada (por ejemplo,

como una cantidad discreta predeterminada si se trata de una sustancia durante un periodo de tiempo relativamente corto (por ejemplo, unos pocos segundos o minutos)).

El término "diámetro" es reconocido en la técnica y se usa en el presente documento para referirse al diámetro físico o al diámetro hidrodinámico de la nanopartícula. El diámetro de una nanopartícula esencialmente esférica puede referirse al diámetro físico o hidrodinámico. El diámetro de una nanopartícula no esférica puede referirse preferentemente al diámetro hidrodinámico. Como se usa en el presente documento, el diámetro de una nanopartícula no esférica puede referirse a la mayor distancia lineal entre dos puntos sobre la superficie de la nanopartícula. Cuando se hace referencia a múltiples nanopartículas, el diámetro de las nanopartículas se refiere normalmente al diámetro promedio de las nanopartículas. El diámetro de las nanopartículas se puede medir usando diversas técnicas en la técnica incluyendo, pero sin limitación, dispersión dinámica de la luz. De acuerdo con la invención, la nanopartícula tiene un diámetro de 120 nm, 130 nm, 140 nm, 150 nm, 160 nm, 170 nm, 180 nm o 190 nm.

El término "matriz extracelular" ("ECM"), como se usa en el presente documento, es una colección de moléculas extracelulares que proporciona soporte estructural y bioquímico a las células circundantes. La composición de la ECM varía entre estructuras multicelulares; sin embargo, la adhesión celular, la comunicación entre células, y la diferenciación son funciones comunes de la ECM. La matriz extracelular animal incluye la matriz intersticial y la membrana basal. La matriz intersticial está presente entre diversas células animales (es decir, en los espacios intercelulares). Los geles de polisacáridos y proteínas fibrosas llenan el espacio intersticial y actúan como un tampón de compresión contra la tensión ejercida sobre la ECM. Las membranas basales son depósitos de ECM de tipo lámina sobre los que descansan diversas células epiteliales. La matriz extracelular del tejido cerebral adulto tiene una composición única. La característica sorprendente de esta matriz es la prominencia de lecticanos, proteoglicanos que contienen un dominio de lectina y un dominio de unión a ácido hialurónico. También son abundantes las proteínas adhesivas/antiadhesivas de la familia del ácido hialurónico y la tenascina. Las proteínas de la matriz, comunes en otros tejidos, están casi ausentes en el cerebro adulto. La matriz extracelular del cerebro parece tener efectos tróficos sobre las células neuronales y afectar al crecimiento de neuritas. La composición única de esta matriz puede ser responsable de la resistencia del tejido cerebral a la invasión de tumores de origen neuronal y no neuronal. El papel de la ECM en el desarrollo, la función y la degeneración neurológicos ha evolucionado de una adhesión física simplista a un sistema de señalización celular intrincado. Si bien la mayoría de las células requieren la adhesión de la ECM para sobrevivir, ahora resulta evidente que la función diferenciada depende íntimamente de la interacción celular con la ECM. Por lo tanto, no es de extrañar que la ECM esté cada vez más implicada en el enigmático proceso de neurodegeneración y desempeñe un papel central en numerosas enfermedades neurológicas.

El término "Fn14", como se usa en el presente documento, significa factor de crecimiento de fibroblastos 14 inducible y es un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) que se induce en diversos tipos de células en situaciones de lesión tisular. Fn14 se activa mediante un inductor débil de apoptosis de tipo TNF (TWEAK), un miembro típico de la familia de ligandos de TNF. Fn14 es un receptor inducible por FGF. A menudo se expresa en niveles bajos en células de tejidos normales y puede regularse positivamente en lesiones o enfermedades, o en células cancerosas (por ejemplo, tumorales). Sin quedar ligado a la teoría, se cree que la estimulación de Fn14 por un ligando de Fn14 (por ejemplo, TWEAK) puede inducir, en algunos casos, la muerte de las células tumorales, y que un anticuerpo anti-Fn14 también será eficaz para destruir las células tumorales. También se cree que Fn14 se sobreexpresa en tumores humanos. Un anticuerpo anti-Fn14 puede desencadenar la muerte de las células tumorales y, por lo tanto, ser terapéuticamente beneficioso en el tratamiento del cáncer. La secuencia de Fn14 humana se muestra como:

MARGSLRRLRLVLGLWLALLRSVAGEQAPGTAPCSRGSWSADLDKCMDCASCRARPHSDFCLGCAAPPAPFR
LLWPILGGALSLTFVLGLLSGFLVWRRRCRRREKFTTPIEETG GEGCPAVALIQ (SEQ ID NO: 1). Las secuencias de proteína Fn14 adicionales incluyen: Fn14 de ratón (por ejemplo, n.º de acceso del NCBI AAF07882 o NP_038777 o Q9CR75 o AAH25860), Fn14 humana (por ejemplo, n.º de acceso del NCBI NP_057723 o BAA94792 o Q9NP84 o AAH02718 o AAF69108); Fn14 de rata (por ejemplo, n.º de acceso del NCBI NP_851600 o AAH60537); y Fn14 de Xenopus (por ejemplo, n.º de acceso del NCBI AAR21225 o NP_001083640). Estas proteínas Fn14 se pueden usar, por ejemplo, como inmunógeno para preparar anticuerpos anti-Fn14. A continuación, los anticuerpos anti-Fn14 se pueden cribar para identificar anticuerpos agonistas, como se describe en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "construcción génica" puede significar una construcción que es capaz de expresar uno o más genes o secuencias de interés en una célula huésped. En determinadas realizaciones, la "construcción genética" se administra mediante una nanopartícula, tal como un vector nanogénico polimérico. Estas nanopartículas sensibles al pH altamente compactadas pueden mediar el silenciamiento de transgenes en gliomas y pueden dirigirse a células de glioblastoma positivas para Fn14.

Como se usa en el presente documento, el término "inhibe el crecimiento de células cancerosas" o "inhibición del crecimiento de células cancerosas" se refiere a cualquier desaceleración de la tasa de proliferación y/o migración de células cancerosas, detención de la proliferación y/o migración de células cancerosas, o destrucción de las células cancerosas, de modo que la tasa de crecimiento de las células cancerosas se reduce en comparación con la tasa de crecimiento observada o prevista de una célula cancerosa de control no tratada. El término "inhibe el crecimiento" también puede referirse a una reducción del tamaño o desaparición de una célula cancerosa o tumor, así como a una reducción de su potencial metastásico. Preferentemente, tal inhibición a nivel celular puede reducir el tamaño, detener

el crecimiento, reducir la agresividad, o prevenir o inhibir la metástasis de un cáncer en un paciente.

Como se usa en el presente documento, el término "intracraneal" significa dentro del cráneo o en o cerca del extremo dorsal de la médula espinal e incluye la médula, el tronco encefálico, la protuberancia anular, el cerebelo y el cerebro.

5 Como se usan en el presente documento, los términos "incorporado" y "encapsulado" se refieren a incorporar, formular o incluir de otro modo un agente activo en y/o sobre una composición que permite la liberación, tal como liberación sostenida, de dicho agente en la aplicación deseada. Los términos contemplan cualquier manera en la que un agente biológicamente activo u otro material se incorpore en una matriz polimérica, incluyendo, por ejemplo: unido a un
10 monómero de dicho polímero (por interacción de unión covalente, iónica u otra), mezcla física, envolviendo al agente en una capa de recubrimiento de polímero, y teniendo dicho monómero como parte de la polimerización para dar una formulación polimérica, distribuida por toda la matriz polimérica, adherida a la superficie de la matriz polimérica (mediante interacciones de unión covalente u otras), encapsulada dentro de la matriz polimérica, etc. El término "incorporación conjunta" o "encapsulación conjunta" se refiere a la incorporación de un agente biológicamente activo
15 u otro material y al menos otro agente biológicamente activo u otro material en una composición objeto.

El término ITEM4, como se usa en el presente documento, es un anticuerpo que reconoce CD266 humano, también conocido de otro modo como receptor Fn14/TWEAK, una glucoproteína transmembrana de 14 kDa de tipo I y miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF12A) expresada por unos pocos tejidos
20 normales y en niveles muy elevados por la mayoría de los tipos de tumores humanos. El anticuerpo ITEM4 reacciona con el receptor TWEAK/Fn14 humano. Fn14 está lejanamente relacionado con la familia TNFR, que contiene un dominio rico en cisteína en la región extracelular y un dominio de unión al factor asociado a TNFR, pero no contiene una región citoplásmica de dominio de muerte (DD). Fn14 desempeña un papel en la migración, proliferación y angiogénesis de células endoteliales inducidas por TWEAK. La muerte celular inducida por TWEAK a través de Fn14
25 incluye tanto la apoptosis como la necrosis y puede bloquearse con un anticuerpo anti-TWEAK, CARL-1. Fn14 se expresa en HUVEC y en algunos tejidos cancerosos, pero no en PBMC recién aisladas. La expresión de ARNm de Fn14 se ha identificado durante la regeneración del hígado. Se ha informado que ITEM4 reacciona de forma cruzada con Fn14 de ratón.

30 Como se usa en el presente documento, el término "administración local" significa la administración directa de un producto farmacéutico en o a las proximidades de un sitio sobre o dentro de un cuerpo animal, en cuyo sitio se desea un efecto biológico del producto farmacéutico. La administración local excluye las vías de administración sistémicas, tal como la administración intravenosa u oral.

35 El término "liposoma" es una vesícula esférica preparada artificialmente compuesta por una bicapa lipídica en fase laminar. El liposoma puede usarse como un vehículo para la administración de nutrientes y fármacos. Los liposomas se pueden preparar alterando las membranas biológicas (tal como mediante sonicación). Los liposomas a menudo están compuestos por fosfolípidos enriquecidos con fosfatidilcolina y también pueden contener cadenas lipídicas mixtas con propiedades tensioactivas tal como fosfatidiletanolamina de huevo. Un diseño de liposoma puede emplear
40 ligandos de superficie para adherirse a tejido no sano. Los principales tipos de liposomas son la vesícula multilaminar (MLV), la vesícula liposómica unilaminar pequeña (SUV), la vesícula unilaminar grande (LUV), y la vesícula cocleato. En determinadas realizaciones, los fármacos anticancerosos tal como paclitaxel, pueden conjugarse con un liposoma o insertarse en un liposoma y administrarse a las células de glioma.

45 El término "nanopartícula", como se usa en el presente documento, se refiere a partículas con un diámetro de 120 nm, 130 nm, 140 nm, 150 nm, 160 nm, 170 nm, 180 nm o 190 nm.

El término "no inmunógeno", como se usa en el presente documento, se refiere al factor de crecimiento endógeno en su estado nativo que normalmente no provoca niveles de anticuerpos circulantes, linfocitos T, o células inmunes reactivas, o solo provoca niveles mínimos, y que normalmente no provoca en el individuo una respuesta inmunitaria
50 contra sí mismo.

El término "enfermedad neurodegenerativa" o "trastorno neurológico", como se usa en el presente documento, significa una enfermedad en la que las neuronas del SNC mueren o pierden su función o tienen una degeneración física que
55 incluye la pérdida (muerte) de axones. Las enfermedades neurodegenerativas incluyen EP, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, y las lesiones cerebrales y de la médula espinal que están asociadas con la muerte de los axones.

El término "polímero", como se usa en el presente documento, recibe su significado ordinario como se usa en la técnica, es decir, una estructura molecular que comprende una o más unidades repetidas (monómeros), conectadas por enlaces covalentes. Las unidades repetidas pueden ser todas idénticas o, en algunos casos, puede haber más de un tipo de unidad repetida presente dentro del polímero. En algunos casos, el polímero puede derivarse biológicamente, es decir, un biopolímero. Los ejemplos no limitantes incluyen péptidos o proteínas. En algunos casos, también pueden estar presentes restos adicionales en el polímero, por ejemplo, restos biológicos tales como los que
60 se describen a continuación. Si está presente más de un tipo de unidad repetida dentro del polímero, entonces se dice que el polímero es un "copolímero".
65

El término "molécula pequeña" se refiere a compuestos, ya sean de origen natural o creados artificialmente (por ejemplo, mediante síntesis química) que tienen un peso molecular relativamente bajo y que no son proteínas, polipéptidos o ácidos nucleicos. Las moléculas pequeñas normalmente tienen múltiples enlaces carbono-carbono (es decir, compuestos orgánicos).

Los términos "sujeto", "huésped" y "paciente", como se usan en el presente documento, se usan indistintamente y significan un animal que está siendo tratado con las presentes composiciones, incluyendo, pero sin limitación, simios, seres humanos, aves, felinos, cánidos, equinos, roedores, bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, animales de granja mamíferos, animales deportivos mamíferos y mascotas mamíferas.

Como se usa en el presente documento, el término "liberación sostenida", como se usa en el presente documento, se refiere a la liberación de una sustancia durante un periodo de tiempo prolongado en contraste con una administración de tipo bolo en la que la cantidad total de la sustancia se hace disponible biológicamente de una vez.

El término "resto de direccionamiento" puede ser un anticuerpo, término que pretende incluir fragmentos de anticuerpos, porciones características de anticuerpos, y pueden identificarse restos de direccionamiento monocatenarios, por ejemplo, usando procedimientos tales como presentación en fagos. Los restos de direccionamiento divulgados en el presente documento se conjugan normalmente con un polímero o copolímero divulgado (por ejemplo, PLA-PEG), y tal conjugado polimérico puede formar parte de una nanopartícula divulgada.

Como se usa en el presente documento, "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad suficiente para tratar a un sujeto que padece una enfermedad (por ejemplo, una enfermedad neurodegenerativa o trastorno neurológico o cáncer de cerebro) o para aliviar un síntoma o una complicación asociada con la enfermedad.

Como se usa en el presente documento, "agente terapéutico" significa un compuesto que tiene un efecto beneficioso y deseable cuando se consume o se aplica. En determinadas realizaciones, los agentes terapéuticos son medicamentos de quimioterapia utilizados para atacar cánceres, por ejemplo, glioblastomas. En otras realizaciones, los agentes terapéuticos son agentes anti-AD, agentes anti-PD, agentes anti-HD, agentes anti-epilepsia). Algunos agentes terapéuticos son de origen biológico y pueden incluir componentes de plantas y minerales, así como productos animales. Otros son sintéticos, producidos en un entorno de laboratorio.

El término "tratar", como se usa en el presente documento, significa ralentizar, detener o revertir la progresión de una enfermedad, particularmente una enfermedad neurodegenerativa. Como se usan en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar", y similares, como se usan en el presente documento, se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una afección o enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una afección o enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la afección o enfermedad. "Tratamiento", incluye cualquier tratamiento de una afección o enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) evitar que la afección o enfermedad o síntoma de la misma se produzca en un sujeto que puede estar predispuesto a la afección o enfermedad, pero aún no se ha diagnosticado que la tenga; (b) inhibir la afección o enfermedad o síntoma de la misma, tal como, detener su desarrollo; y (c) mitigar, aliviar o mejorar la afección o enfermedad o síntoma de la misma, tal como, por ejemplo, provocar la regresión de la afección o enfermedad o síntoma de la misma.

2. Visión general

Un sistema de administración dirigida basado en particulado específico de estructura en determinadas realizaciones comprende una nanopartícula, que tiene un diámetro de 120 nm, 130 nm, 140 nm, 150 nm, 160 nm, 170 nm, 180 nm o 190 nm. La nanopartícula está recubierta con un recubrimiento de polímero de polietilenglicol (PEG) sobre la superficie de la nanopartícula que tiene una densidad superficial de al menos 0,1 moléculas de PEG por nm² y está configurada para evitar la unión no específica a la matriz extracelular y penetrar la matriz extracelular. Se conjuga un resto de direccionamiento en una superficie de la nanopartícula y se configura para promover la unión específica a una molécula de la superficie celular expresada por una célula diana tal como una célula de tumor cerebral. Por último, un agente terapéutico (tal como un agente anticanceroso), en el que el agente terapéuticamente activo se selecciona para potenciar una respuesta deseada en la célula diana intracelular o extracelularmente.

3. Antecedentes

Enfermedades y trastornos cerebrales y enfermedades neurodegenerativas

a. Glioblastoma

Los GBM son tumores que surgen de los astrocitos, las células en forma de estrella que forman el tejido "de tipo pegamento" o de soporte del cerebro. Estos tumores suelen ser muy malignos (cancerosos) porque las células se reproducen rápidamente y están respaldadas por una gran red de vasos sanguíneos. Los glioblastomas generalmente

se encuentran en los hemisferios cerebrales del cerebro, pero se pueden encontrar en cualquier parte del cerebro o la médula espinal. Los glioblastomas suelen contener una mezcla de tipos de células. No es raro que estos tumores contengan minerales quísticos, depósitos de calcio, vasos sanguíneos, o un grado mixto de células. Los glioblastomas suelen ser muy malignos: se reproduce una gran cantidad de células tumorales en un momento dado y se nutren de un abundante suministro de sangre. También se pueden ver células muertas, especialmente hacia el centro del tumor. Debido a que estos tumores provienen de células cerebrales normales, es fácil para ellos invadir y vivir dentro del tejido cerebral normal. Sin embargo, el glioblastoma rara vez se disemina a otras partes del cuerpo.

Existen dos tipos de glioblastomas: primarios o *de novo*: Primarios: Estos tumores tienden a formarse y dar a conocer su presencia rápidamente. Esta es la forma más común de glioblastoma; es muy agresivo. Secundarios: Estos tumores tienen un historial de crecimiento más largo y algo más lento, pero aún son muy agresivos. Pueden comenzar como tumores de menor grado que eventualmente se vuelven de mayor grado. Suelen encontrarse en personas de 45 años o menos y representan aproximadamente el 10 % de los glioblastomas. Debido a que los glioblastomas pueden crecer rápidamente, los síntomas más comunes suelen ser causados por un aumento de presión en el cerebro. Estos síntomas pueden incluir dolor de cabeza, náuseas, vómitos y somnolencia. Dependiendo de la ubicación del tumor, los pacientes pueden desarrollar diversos síntomas diferentes, tales como debilidad en un lado del cuerpo, dificultades con la memoria o el habla, y cambios visuales. Este tumor representa aproximadamente el 17 % de todos los tumores cerebrales primarios y aproximadamente el 60-75 % de todos los astrocitomas. Aumentan en frecuencia con la edad y afectan a más hombres que mujeres. Solo el tres por ciento de los tumores cerebrales infantiles son glioblastomas. Al igual que muchos tipos de tumores, se desconoce la causa exacta del glioblastoma.

El glioblastoma puede ser difícil de tratar porque los tumores contienen muchos tipos diferentes de células. Algunas células pueden responder bien a ciertas terapias, mientras que otras pueden no verse afectadas en absoluto. Es por eso que el plan de tratamiento para el glioblastoma puede combinar varios enfoques. El primer paso para tratar el glioblastoma es un procedimiento para hacer un diagnóstico, aliviar la presión sobre el cerebro, y extirpar de manera segura la mayor cantidad de tumor posible a través de cirugía. Debido a que los glioblastomas tienen tentáculos en forma de dedos, son muy difíciles de eliminar por completo. Esto es particularmente cierto cuando crecen cerca de las partes del cerebro que controlan funciones importantes tales como el lenguaje y la coordinación. Se pueden usar radiación y quimioterapia para retrasar el crecimiento de tumores que no se pueden extirpar con cirugía. La quimioterapia también se puede utilizar para retrasar la necesidad de radiación en niños pequeños.

El pronóstico usualmente se informa en años de "supervivencia media". La supervivencia media es el tiempo en el que un número igual de pacientes mejora y un número igual de pacientes empeora. Con el tratamiento estándar, la supervivencia media de los adultos con un astrocitoma anaplásico es de aproximadamente dos a tres años. Para los adultos con glioblastoma más agresivo, tratados con temozolamida y radioterapia simultáneas, la supervivencia media es de aproximadamente 14,6 meses y la supervivencia a dos años es del 30 %. Sin embargo, un estudio de 2009 informó que casi el 10 % de los pacientes con glioblastoma pueden vivir cinco años o más. Los niños con tumores de alto grado (grados III y IV) tienden a tener mejores resultados que los adultos; la supervivencia a cinco años en niños es de aproximadamente el 25 %. Además, los pacientes con glioblastoma a los que se les ha desactivado el gen MGMT mediante un proceso llamado metilación también tienen tasas de supervivencia prolongadas. Se cree que el gen MGMT es un predictor de respuesta significativo. Sin embargo, no todos los glioblastomas tienen las mismas anomalías biológicas. Esta puede ser la razón por la que diferentes pacientes responden de manera diferente al mismo tratamiento y por qué diferentes pacientes con el mismo tumor tienen diferentes resultados. Los investigadores continúan estudiando las características comunes de los supervivientes de tumores cerebrales a largo plazo y cómo los tratamientos personalizados y dirigidos pueden usarse de manera óptima para tratar a los pacientes con tumores cerebrales.

b. Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno del movimiento neurodegenerativo, solo superado por la enfermedad de Alzheimer (EA) en prevalencia (aproximadamente 350 por 100.000 habitantes). Se caracteriza clínicamente por rigidez, lentitud de movimiento y temblor. La mayoría de los casos de enfermedad de Parkinson son esporádicos, pero las formas esporádica y familiar de la enfermedad se caracterizan por cuerpos de Lewy intracelulares en neuronas moribundas de la SN, una población de neuronas del mesencéfalo (~60.000) que son diezmadas selectivamente en la EP. Los cuerpos de Lewy se componen predominantemente de alfa-sinucleína. Se han encontrado mutaciones y duplicaciones del gen que codifica alfa-sinucleína en pacientes con la enfermedad de Parkinson familiar. Otro gen asociado con la EA autosómica recesiva es la parkina. Se observan cuerpos de Lewy corticales difusos compuestos por alfa-sinucleína en la enfermedad de cuerpos de Lewy (LBD), un síndrome demencial asociado con los cambios en el tono parkinsoniano, alucinaciones y fluctuación rápida de los síntomas. La LBD puede ser la segunda forma más común de demencia neurodegenerativa después de la EA, representando del 20 al 30 por ciento de los casos entre las personas mayores de 60 años. De forma similar al enfoque de la vacuna contra la enfermedad de Alzheimer, se han obtenido resultados prometedores en un modelo murino de la enfermedad de Parkinson/cuerpos de Lewy mediante la inmunización con alfa sinucleína. Otros síndromes demenciales incluyen las demencias fronto-temporales, la enfermedad de Pick y la demencia corticobasal, y otras conocidas por la medicina neurológica.

c. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa demencial de la memoria y la cognición desordenada común asociada con la acumulación cerebral de placas extracelulares compuestas predominantemente por los péptidos A β (1-40), A β (1-42) y A β (1-43), todos los cuales son productos proteolíticos de APP. Además, los ovillos neurofibrilares, compuestos principalmente por proteína tau fosforilada anormalmente (una proteína neuronal asociada a microtúbulos), se acumulan intracelularmente en las neuronas moribundas. La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la degeneración de neuronas y axones. [5]. Las formas familiares de EA pueden estar causadas por mutaciones en el gen APP, o en los genes de presenilina 1 o 2, cuyos productos proteicos están implicados en el procesamiento de APP en A β . Las variantes alélicas de la apolipoproteína E también influyen en la edad al inicio de las formas de EA tanto esporádica como familiar. A β , tau y tau fosforilada se han detectado en la sangre y en el LCR de pacientes con EA, y en controles normales. La inmunización de pacientes con la enfermedad de Alzheimer con A β ha mostrado algunos resultados preliminares de tratamiento prometedores, aunque limitados por la meningoencefalitis autoinmune en seres humanos.

d. Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (HD) es una enfermedad neuropsiquiátrica hereditaria autosómica dominante que da lugar a síntomas motores, cognitivos y conductuales progresivos. El curso del Huntington se caracteriza por movimientos espasmódicos incontrolables de las extremidades, el tronco y la cara (corea); pérdida progresiva de habilidades mentales; y el desarrollo de problemas psiquiátricos. La enfermedad de Huntington progresa sin remisión durante 10 a 15 años y suele aparecer en la mediana edad (30-50 años). La EH juvenil (también denominada variante de Westphal o EH acinético-rígida) se desarrolla antes de los 20 años, progresa rápidamente y produce rigidez muscular en la que el paciente se mueve poco, si es que lo hace (acinesia). Se estima que una de cada 10.000 personas, casi 30.000 en los Estados Unidos, tiene la enfermedad de Huntington. La enfermedad de Huntington juvenil ocurre en aproximadamente el 16 % de todos los casos. Su patología central implica la degeneración de los ganglios basales, en particular, el caudado y el putamen, y está causada por una expansión inestable del trinucleótido CAG, que codifica la glutamina, en un solo gen autosómico IT-15 en el cromosoma 4, que codifica una forma mutada de la proteína, la huntingtina. No se comprende bien cómo la mutación del gen IT-15 altera la función de la proteína. En la enfermedad de Huntington, la disfunción de la sinapsis es el evento observable más temprano, seguido de cerca por la degeneración axonal, a menudo sin signos de pérdida de neuronas en modelos animales. [6].

El tratamiento de la enfermedad de Huntington se centra en reducir los síntomas, prevenir complicaciones y proporcionar apoyo y asistencia al paciente. Existen varias sustancias disponibles en la actualidad para el tratamiento de la corea. Se pueden tratar otros síntomas neurológicos, tal como la distonía, pero el tratamiento se asocia con un alto riesgo de eventos adversos. Los síntomas psiquiátricos, por otro lado, a menudo son susceptibles de tratamiento y el alivio de estos síntomas puede proporcionar una mejora significativa en la calidad de vida. [7]. La mayoría de los fármacos que se usan para tratar los síntomas de la EH tienen efectos secundarios tales como fatiga, inquietud o hiperexcitabilidad. La cistamina (descarboxicistina) alivia los temblores y prolonga la vida en ratones con la mutación genética de la enfermedad de Huntington (EH). El fármaco parece funcionar aumentando la actividad de las proteínas que protegen las células nerviosas, o neuronas, de la degeneración. El estudio sugiere que un tratamiento similar podría algún día ser útil en seres humanos con EH y trastornos relacionados. [8].

En la presente memoria descriptiva, la invención se ha descrito con referencia a realizaciones específicas de la misma. Sin embargo, será evidente que se pueden realizar diversas modificaciones y cambios sin apartarse del espíritu y alcance más amplios de la invención. La memoria descriptiva y los dibujos deben considerarse, por consiguiente, en un sentido ilustrativo más que restrictivo. El contenido de todas las referencias, solicitudes de patente pendientes y patentes publicadas, que se citan a lo largo de esta solicitud, se incorporan expresamente por la presente por referencia como si se expusieran en el presente documento en su totalidad, excepto cuando la terminología no sea coherente con las definiciones del presente documento. Aunque se emplean términos específicos, se utilizan como en la técnica a menos que se indique de otro modo.

e. Epilepsia

Una convulsión es un evento paroxístico debido a descargas anormales, excesivas, e hipsincrónicas de un agregado de neuronas del sistema nervioso central. La epilepsia describe una afección en la que una persona tiene convulsiones recurrentes debido a un proceso subyacente crónico. Entre las muchas causas de la epilepsia, hay diversos síndromes de epilepsia en los que las características clínicas y patológicas son distintivas y sugieren una etiología subyacente específica. La prevalencia de la epilepsia se ha estimado en 5 a 10 personas por 1000 habitantes. El traumatismo craneoencefálico penetrante grave se asocia con hasta un 50 % de riesgo de provocar epilepsia. Otras causas de epilepsia incluyen ictus, infección y susceptibilidad genética. La terapia con fármacos antiepilépticos es el pilar del tratamiento para la mayoría de los pacientes con epilepsia y se han utilizado diversos fármacos. [9].

El veinte por ciento de los pacientes con epilepsia son resistentes a la terapia con fármacos a pesar de los esfuerzos por encontrar una combinación eficaz de fármacos antiepilépticos. Entonces, la cirugía puede ser una opción. Se puede usar monitorización por vídeo-EEG para definir la ubicación anatómica del foco de la convulsión y para correlacionar la actividad electrofisiológica anormal con las manifestaciones conductuales de la convulsión. Los

registros de rutina del cuero cabelludo o del cuero cabelludo-esfenoidales suelen ser suficientes para la localización. Se utiliza de forma rutinaria una resonancia magnética de alta resolución para identificar lesiones estructurales. Los estudios de imágenes funcionales tales como SPECT y PET son pruebas complementarias que pueden ayudar a verificar la localización de una región epileptogénica aparente con una anomalía anatómica. Una vez que se identifica la presunta ubicación del inicio de la convulsión, se pueden utilizar estudios adicionales, incluidas pruebas neuropsicológicas y la prueba de amobarbital intracarotídeo (prueba de Wada) para evaluar la localización del lenguaje y la memoria y para determinar las posibles consecuencias funcionales de la extirpación quirúrgica de la región epileptogénica.

En algunos casos, la extensión exacta de la resección a realizar se puede determinar realizando un mapeo cortical en el momento del procedimiento quirúrgico. Se trata de registros electrofisiológicos y estimulación cortical del paciente despierto para identificar la extensión de las alteraciones epileptiformes y la función de las regiones corticales en cuestión. El procedimiento quirúrgico más común para pacientes con epilepsia del lóbulo temporal implica la resección del lóbulo temporal anteromedial (lobectomía temporal) o una extirpación más limitada del hipocampo y la amígdala subyacentes. Las convulsiones focales que surgen de regiones extratemporales pueden suprimirse mediante una resección neocortical focal. Desafortunadamente, aproximadamente el 5 % de los pacientes todavía pueden desarrollar complicaciones clínicamente significativas de la cirugía y aproximadamente el 30 % de los pacientes tratados con lobectomía temporal todavía tendrán convulsiones. La epilepsia focal puede afectar a casi cualquier parte del cerebro y normalmente es el resultado de una lesión localizada de anomalía funcional. Un tipo de epilepsia focal es la convulsión psicomotora. La terapia actual incluye el uso de un EEG para localizar ondas punzantes anormales que se originan en áreas de enfermedad cerebral orgánica que predisponen a ataques epilépticos focales, seguido de la escisión quirúrgica del foco para prevenir ataques futuros.

f. Otros cánceres

La sobreexpresión del receptor Fn14 se ha detectado en muchos tipos de tumores sólidos (vejiga, cerebro, mama, cuello del útero, colorrectal, esofágico, hígado, pulmón, piel, ovario, páncreas, próstata, riñón, testículo) y en metástasis tumorales (hueso, hígado, ganglio linfático cerebral). Por ejemplo, Feng et al. [45] utilizaron análisis de transferencia de Northern para comparar los niveles de ARNm de Fn14 en tejido tumoral de HCC frente a tejido hepático no tumoral adyacente y encontraron niveles elevados de expresión del gen Fn14 en tres de los cuatro especímenes tumorales examinados. Estos investigadores también detectaron la inducción de ARNm de Fn14 en dos modelos de ratón transgénico de hepatocarcinogénesis. En otro estudio, Michaelson et al. [46] examinaron la expresión del gen Fn14 en muestras de tejido mamario normal y de tumores primarios de mama utilizando dos enfoques experimentales: hibridación *in situ* e inmunohistoquímica. Se detectó expresión de ARNm de Fn14 en 0/10 especímenes de tejido normal y 35/60 especímenes de tumor de mama utilizando el primer enfoque y, en un conjunto diferente de muestras, se detectó expresión de proteína Fn14 en 1/10 especímenes de tejido normal y 10/19 especímenes de tumor de mama utilizando el segundo enfoque.

4. Realizaciones

En determinadas realizaciones, el movimiento relativamente libre de nanopartículas dentro del tejido cerebral a través de una unión no específica mínima y la consideración de restricciones estéricas relacionadas con el tamaño se ha logrado mediante la utilización de un sistema de administración dirigida basado en particulado específico de estructura. Específicamente, en determinadas realizaciones, esta difusividad mejorada permitió el desarrollo de una estrategia de direccionamiento selectiva para modelar vehículos de fármacos particulados en tumores de xenoinjerto experimentales dentro del cerebro. Cuando se administraron por vía intracraneal, en determinadas enseñanzas, nanopartículas dirigidas a Fn14 recubiertas con PEG de ~100 nm (CNP-ITEM4) mostraron una amplia distribución en el cerebro y un direccionamiento selectivo a las células tumorales positivas para Fn14 en ratones portadores de xenoinjertos tumorales U87 humanos. Las células tumorales ubicadas en sitios distantes, en lo profundo del cerebro, probablemente contribuyan a la recidiva del tumor, ya que no se pueden extirpar con cirugía y son las más difíciles de tratar debido a la proximidad de las células cerebrales en funcionamiento y la BHE intacta. Por lo tanto, la reducción de la unión no específica hacia la ECM cerebral es una etapa crítica que limita la velocidad en el desarrollo de tratamientos dirigidos eficaces. El direccionamiento específico de tumor de nanopartículas se puede mejorar mediante un equilibrio de (i) unión no específica mínima para proporcionar una amplia dispersión de partículas y (ii) unión selectiva a células de glioma distantes a través de Fn14, una molécula de la superficie celular expresada por estas células.

Fn14, el miembro más pequeño de la superfamilia TNFR, es una diana molecular emergente para la terapia de GBM [10-11]. Fn14 se expresa mínimamente en el cerebro humano normal, pero se expresa altamente en gliomas neoplásicos con características más agresivas e invasivas [12]. Es importante destacar que se ha detectado una expresión elevada de ARNm y proteínas Fn14 en el borde de las células de glioma invasoras con menos elevación en el núcleo tumoral, lo que brinda la oportunidad de dirigirse a las células invasoras con agentes terapéuticos dirigidos a Fn14 [12-13]. El anticuerpo monoclonal específico de Fn14 ITEM4 se usó como el resto de direccionamiento en nuestros estudios iniciales. Esta molécula de direccionamiento fue elegida basándose en estudios anteriores que revelaron que las células cancerosas positivas para Fn14 son vulnerables a las inmunotoxinas basadas en ITEM4 [14-16]. Aunque los anticuerpos monoclonales introducen algunas limitaciones inherentes; específicamente, su tamaño

relativamente grande y la presencia de la región Fc pueden contribuir a efectos inespecíficos (por ejemplo, unión, reconocimiento y eliminación celular), la unión altamente específica de un anticuerpo monoclonal completo permitió una importante determinación de prueba de concepto en este estudio.

Las terapias y los ensayos clínicos actuales que utilizan estrategias terapéuticas dirigidas y no dirigidas para GBM se han visto afectados por una distribución limitada dentro del cerebro. Por ejemplo, se demostró que la carmustina se difunde unos pocos milímetros desde la superficie de la oblea de polímero Gliadel implantable durante la mayor parte de la fase de liberación *in vivo* [17]. Además, los ensayos clínicos recientes han demostrado que la CED de toxinas dirigidas, tales como toxinas conjugadas con IL-13, IL-4 y transferrina, así como partículas virales, no mostraron mejoras en la supervivencia. Lo más probable es que esto se deba a que la penetración y distribución del agente terapéutico todavía es limitada [17, 18]. En otros ejemplos, Voges *et al.* y Zhou *et al.* demostraron que incluso después de la CED, la ECM actúa como una barrera de difusión que limita la distribución espacial de las nanopartículas terapéuticas [19-21]. Por lo tanto, la difusión y distribución de terapias dentro del cerebro y los tumores cerebrales es una limitación importante para lograr una eficacia de tratamiento significativa, incluso con estos enfoques terapéuticos locales. Se cree que esto es especialmente importante para el GBM dada la naturaleza invasiva y migratoria de la enfermedad [22].

Estudios recientes sugieren que las terapias de nanopartículas dirigidas ofrecen el potencial de administrar agentes directamente a las células tumorales invasoras para mejorar la eficacia del tratamiento mientras se minimizan las toxicidades asociadas [23]. En un ejemplo, las nanopartículas a base de quitosano conjugado con clorotoxina mostraron una acumulación preferencial en gliomas en ratones [24]. En otro estudio, los liposomas conjugados con IL-13 fueron capaces de administrar doxorubicina específicamente a las células de glioma [25]. Sin embargo, el logro de una amplia distribución de partículas y el direccionamiento de nanopartículas terapéuticamente relevantes sigue siendo un desafío. La difusión de nanopartículas en el cerebro tiene lugar predominantemente a través de espacios estrechos y tortuosos entre las células [26-27]. La ECM, el componente principal del espacio extracelular, impone una barrera adhesiva y estérica a la difusión de nanopartículas a través del parénquima cerebral, como se muestra con las nanopartículas no recubiertas (UNP) de 100 nm en este estudio. Vargova y sus colegas también encontraron que la fracción de volumen de ECS y la tortuosidad aumentan con el grado histopatológico del glioma, aumentando aún más las barreras de difusión para moléculas pequeñas y nanopartículas [28]. Por lo tanto, la penetración limitada de nanopartículas terapéuticas dirigidas en el ECS sigue siendo un obstáculo clave para (i) la distribución eficaz del fármaco dentro de las regiones afectadas por tumores cerebrales, y (ii) el direccionamiento a estructuras relacionadas con el tumor donde el movimiento a través del tejido cerebral y solo el direccionamiento a estructuras específicas puede mejorar la eficacia y reducir la toxicidad.

En determinadas realizaciones, es posible minimizar la unión no específica a la ECM del cerebro en el diseño de un sistema de nanopartículas dirigido que penetran en el tejido cerebral, que a continuación permite el direccionamiento selectivo a las células tumorales a través de una unión inespecífica mínima. La demostración aquí de la distribución mejorada de partículas y el direccionamiento tumoral sugiere una oportunidad prometedora para el desarrollo de nuevas estrategias de formulación para el cerebro y otros cánceres. Basándose en las características de la formulación desarrolladas aquí en nanopartículas de poliestireno modelo, se visualizan plataformas de administración de fármacos que pueden traducirse fácilmente en nuevos sistemas terapéuticos, tales como nanopartículas de PLGA biodegradables. Una estrategia similar puede adaptarse a diversos diferentes polímeros, fármacos, construcciones génicas y ligandos de direccionamiento aprobados por la FDA. Estos resultados apoyan una mayor investigación sobre el uso de la plataforma de nanopartículas dirigida a Fn14 con CED y otros enfoques de administración novedosos para GBM para mejorar potencialmente la distribución y la duración de los efectos terapéuticos. Fn14 también se sobreexpresa en una amplia gama de otros cánceres fuera del cerebro [10-12], incluidos melanoma [14], mama [29], próstata [30] y cáncer de pulmón de células no pequeñas [31]. Por consiguiente, una plataforma de nanopartículas dirigida a Fn14 puede tener una aplicabilidad más amplia más allá de la terapia de pacientes con GBM en el futuro.

Polímeros

En algunas realizaciones, las nanopartículas de la invención comprenden una matriz polimérica y un agente biológicamente activo. En algunas realizaciones, se puede asociar un resto de direccionamiento con al menos parte de la matriz polimérica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un resto de direccionamiento (por ejemplo, un anticuerpo o ligando) se puede asociar covalentemente con la superficie de una matriz polimérica. En algunas realizaciones, la asociación covalente está mediada por un enlazador. El agente de direccionamiento puede estar asociado con la superficie de, encapsulado dentro de, rodeado, y/o disperso por toda la matriz polimérica.

Se conoce una amplia diversidad de polímeros y métodos para formar partículas a partir de los mismos en la técnica de la administración de fármacos. En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a nanopartículas con al menos dos macromoléculas, donde la primera macromolécula comprende un primer polímero unido a un ligando de bajo peso molecular (por ejemplo, resto de direccionamiento); y la segunda macromolécula que comprende un segundo polímero que no está unido a un resto de direccionamiento. La nanopartícula puede incluir opcionalmente uno o más polímeros adicionales no funcionalizados.

Se puede usar cualquier polímero de acuerdo con la presente invención. Los polímeros pueden ser polímeros naturales

o no naturales (sintéticos). Los polímeros pueden ser homopolímeros o copolímeros que comprenden dos o más monómeros. En términos de secuencia, los copolímeros pueden ser aleatorios, de bloque o comprender una combinación de secuencias aleatorias y de bloque. Normalmente, los polímeros de acuerdo con la presente invención son polímeros orgánicos. Los ejemplos no limitantes incluyen péptidos o proteínas. En algunos casos, también pueden estar presentes restos adicionales en el polímero, por ejemplo, restos biológicos tales como los que se describen a continuación.

Debe entenderse que en cualquier realización que emplee un polímero, el polímero que se emplea puede ser un copolímero en algunos casos. Las unidades repetidas que forman el copolímero pueden disponerse de cualquier forma. Por ejemplo, las unidades repetidas pueden disponerse en un orden aleatorio, en un orden alterno, o como un copolímero de bloque, es decir, comprendiendo una o más regiones, cada una de las cuales comprende una primera unidad repetida (por ejemplo, un primer bloque), y comprendiendo una o más regiones, cada una de las cuales comprende una segunda unidad de repetición (por ejemplo, un segundo bloque), etc. Los copolímeros de bloque pueden tener dos (un copolímero dibloque), tres (un copolímero tribloque) o más números de bloques distintos.

Las partículas divulgadas pueden incluir copolímeros, que, en algunas realizaciones, describen dos o más polímeros (tales como los descritos en el presente documento) que se han asociado entre sí, normalmente mediante enlace covalente de dos o más polímeros juntos. Por lo tanto, un copolímero puede comprender un primer polímero y un segundo polímero, que se han conjugado entre sí para formar un copolímero de bloque donde el primer polímero puede ser un primer bloque del copolímero de bloque y el segundo polímero puede ser un segundo bloque del copolímero de bloque. Por supuesto, los expertos en la técnica entenderán que un copolímero de bloque puede contener, en algunos casos, múltiples bloques de polímero, y que un "copolímero de bloque", como se usa en el presente documento, no se limita a solo copolímeros de bloque que tienen solo un solo primer bloque y un solo segundo bloque. Por ejemplo, un copolímero de bloque puede comprender un primer bloque que comprende un primer polímero, un segundo bloque que comprende un segundo polímero, y un tercer bloque que comprende un tercer polímero o el primer polímero, etc. En algunos casos, los copolímeros de bloque pueden contener cualquier número de primeros bloques de un primer polímero y segundos bloques de un segundo polímero (y en determinados casos, terceros bloques, cuartos bloques, etc.). Además, cabe señalar que los copolímeros de bloque también pueden formarse, en algunos casos, a partir de otros copolímeros de bloque. Por ejemplo, un primer copolímero de bloque se puede conjugar con otro polímero (que puede ser un homopolímero, un biopolímero, otro copolímero de bloque, etc.), para formar un nuevo copolímero de bloque que contiene múltiples tipos de bloques y/o con otros restos (por ejemplo, con restos no poliméricos).

En algunas realizaciones, el polímero (por ejemplo, copolímero, por ejemplo, copolímero de bloque) puede ser anfílico, es decir, tener una parte hidrófila y una parte hidrófoba, o una parte relativamente hidrófila y una parte relativamente hidrófoba. Un polímero hidrófilo puede ser uno que generalmente atrae agua y un polímero hidrófobo puede ser uno que generalmente repele el agua. Puede identificarse un polímero hidrófilo o hidrófobo, por ejemplo, preparando una muestra del polímero y midiendo su ángulo de contacto con el agua. En algunos casos, la hidrofilia de dos o más polímeros se puede medir entre sí, es decir, un primer polímero puede ser más hidrófilo que un segundo polímero. Por ejemplo, el primer polímero puede tener un ángulo de contacto más pequeño que el segundo polímero.

En un conjunto de realizaciones, un polímero (por ejemplo, copolímero, por ejemplo, copolímero de bloque) contemplado en el presente documento incluye un polímero biocompatible, es decir, el polímero que normalmente no induce una respuesta adversa cuando se inserta o se inyecta en un sujeto vivo, por ejemplo, sin inflamación significativa y/o rechazo agudo del polímero por parte del sistema inmunitario, por ejemplo, a través de una respuesta de linfocitos T. Por consiguiente, las partículas terapéuticas contempladas en el presente documento pueden ser no inmunógenas. La biocompatibilidad se refiere normalmente al rechazo agudo de material por al menos una parte del sistema inmunitario, es decir, un material no biocompatible implantado en un sujeto provoca una respuesta inmunitaria en el sujeto que puede ser lo suficientemente grave como para que el rechazo del material por parte del sistema inmunitario no pueda controlarse adecuadamente y, a menudo, es de un grado tal que el material debe eliminarse del sujeto. Una prueba sencilla para determinar la biocompatibilidad puede ser exponer un polímero a las células *in vitro*; los polímeros biocompatibles son polímeros que normalmente no darán como resultado una muerte celular significativa a concentraciones moderadas, por ejemplo, a concentraciones de 50 microgramos/10⁶ células. Por ejemplo, un polímero biocompatible puede causar menos de aproximadamente un 20 % de muerte celular cuando se expone a células tales como fibroblastos o células epiteliales, incluso si es fagocitado o captado por dichas células. Los ejemplos no limitantes de polímeros biocompatibles que pueden ser útiles en diversas realizaciones de la presente invención incluyen polidioxanona (PDO), polihidroxialcanoato, polihidroxibutirato, poli(sebacato de glicerol), poliglicolida, polilactida, PLGA, policaprolactona, o copolímeros o derivados que incluyen estos y/u otros polímeros. En determinadas realizaciones, el polímero biodegradable se selecciona del grupo que consiste en: PLGA, PLA, PCL, quitosano, gelatina, albúmina y PAC.

En determinadas realizaciones, los polímeros biocompatibles contemplados pueden ser biodegradables, es decir, el polímero puede degradarse, química y/o biológicamente, dentro de un entorno fisiológico, tal como dentro del cuerpo. En una realización, el polímero biodegradable y sus subproductos de degradación pueden ser biocompatibles. Por ejemplo, un polímero contemplado puede ser uno que se hidroliza espontáneamente tras la exposición al agua (por ejemplo, dentro de un sujeto), el polímero puede degradarse tras la exposición al calor (por ejemplo, a temperaturas

de aproximadamente 37 °C). La degradación de un polímero puede tener lugar a velocidades variables, dependiendo del polímero o copolímero usado. Por ejemplo, la semivida del polímero (el tiempo en el que el 50 % del polímero puede degradarse en monómeros y/u otros restos no poliméricos) puede ser del orden de días, semanas, meses o años, dependiendo del polímero. Los polímeros pueden degradarse biológicamente, por ejemplo, por actividad

enzimática o maquinaria celular, en algunos casos, por ejemplo, a través de la exposición a una lisozima (por ejemplo, que tiene un pH relativamente bajo). En algunos casos, los polímeros se pueden descomponer en monómeros y/u otros restos no poliméricos que las células pueden reutilizar o eliminar sin un efecto tóxico significativo en las células (por ejemplo, la polilactida puede hidrolizarse para formar ácido láctico, la poliglicolida puede hidrolizarse para formar ácido glicólico, etc.).

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser poliésteres, incluyendo copolímeros que comprenden unidades de ácido láctico y ácido glicólico, tales como poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) y poli(lactida-co-glicolida), denominados colectivamente en el presente documento "PLGA"; y homopolímeros que comprenden unidades de ácido glicólico, denominados en el presente documento "PGA", y unidades de ácido láctico, tales como poli-ácido L-láctico, poli-ácido D-láctico, poli-ácido D,L-láctico, poli-L-lactida, poli-D-lactida y poli-D,L-lactida, denominados colectivamente en el presente documento "PLA". En algunas realizaciones, los poliésteres ilustrativos incluyen, por ejemplo, polihidroxiácidos; polímeros y copolímeros PEGilados de lactida y glicolida (por ejemplo, PLA PEGilado, PGA PEGilado, PLGA PEGilado, y derivados de los mismos. En algunas realizaciones, los poliésteres incluyen, por ejemplo, polianhídridos, poli(orto éster), poli(orto éster) PEGilado, poli(caprolactona), poli(caprolactona) PEGilada, polilisina, polilisina PEGilada, poli(etilenimina), poli(etilenimina) PEGilada, poli(L-lactida-co-L-lisina), poli(éster de serina), poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina), poli[ácido alfa-(4-aminobutil)-L-glicólico] y derivados de los mismos.

En algunas realizaciones, un polímero puede ser PLGA. PLGA es un copolímero biocompatible y biodegradable de ácido láctico y ácido glicólico, y diversas formas de PLGA pueden caracterizarse por la relación de ácido láctico:ácido glicólico. El ácido láctico puede ser ácido L-láctico, ácido D-láctico o ácido D,L-láctico. La velocidad de degradación de PLGA puede ajustarse alterando la relación ácido láctico:ácido glicólico. En algunas realizaciones, el PLGA a utilizar de acuerdo con la presente invención puede caracterizarse por una relación ácido láctico:ácido glicólico de aproximadamente 85:15, aproximadamente 75:25, aproximadamente 60:40, aproximadamente 50:50, aproximadamente 40:60, aproximadamente 25:75, o aproximadamente 15:85. En algunas realizaciones, la relación de monómeros de ácido láctico con respecto a ácido glicólico en el polímero de la partícula (por ejemplo, el copolímero de bloque PLGA o el copolímero de bloque PLGAPEG), se puede seleccionar para optimizar diversos parámetros tales como la captación de agua, la liberación de agente biológicamente activo y/o la cinética de degradación del polímero.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser uno o más polímeros acrílicos. En determinadas realizaciones, los polímeros acrílicos incluyen, por ejemplo, copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo, metacrilatos de etoxietilo, metacrilato de cianoetilo, copolímero de metacrilato de amino alquilo, poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), copolímero de alquilamida de ácido metacrílico, poli(metacrilato de metilo), poli(poliacrilamida del ácido metacrílico), copolímero de metacrilato de amino alquilo, copolímeros de metacrilato de glicidilo, policianoacrilatos, y combinaciones que comprenden uno o más de los polímeros anteriores. El polímero acrílico puede comprender copolímeros totalmente polimerizados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico con un contenido bajo de grupos amonio cuaternario.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser polímeros catiónicos. En general, los polímeros catiónicos son capaces de condensar y/o proteger cadenas de ácidos nucleicos cargadas negativamente (por ejemplo, ADN, ARN o derivados de los mismos). Se contempla el uso de polímeros que contienen amina, tales como poli(lisina), polietilenimina (PEI), y dendrímeros de poli(amidoamina), en algunas realizaciones, en una partícula divulgada.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser poliésteres degradables que llevan cadenas laterales catiónicas. Los ejemplos de estos poliésteres incluyen poli(L-lactida-co-L-lisina), poli(éster de serina), poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina). Las partículas divulgadas en el presente documento pueden contener o no PEG. Además, determinadas realizaciones pueden estar dirigidas hacia copolímeros que contienen poli(éster-éteres), por ejemplo, polímeros que tienen unidades repetidas unidas por enlaces éster (por ejemplo, enlaces R-C(O)-O-R') y enlaces éter (por ejemplo, enlaces R-O-R'). En algunas realizaciones de la invención, un polímero biodegradable, tal como un polímero hidrolizable, que contiene grupos de ácido carboxílico, puede conjugarse con unidades repetidas de poli(etilenglicol) para formar un poli(éster-éter). Un polímero (por ejemplo, copolímero, por ejemplo, copolímero de bloque) que contiene unidades repetidas de poli(etilenglicol) también puede denominarse polímero "PEGilado". Se contempla que el PEG puede terminar e incluir un grupo terminal, por ejemplo, cuando el PEG no está conjugado con un ligando. Por ejemplo, el PEG puede terminar en un grupo hidroxilo, metoxi u otro grupo alcoxilo, un grupo metilo u otro grupo alquilo, un grupo arilo, un ácido carboxílico, una amina, una amida, un grupo acetilo, un grupo guanidino o un imidazol. Otros grupos terminales contemplados incluyen restos azida, alquino, maleimida, aldehído, hidrazida, hidroxilamina, alcoxiimina o tiol. Los expertos en la técnica conocerán métodos y técnicas para PEGilar un polímero, por ejemplo, usando EDC (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y NHS (N-hidroxisuccinimida) para hacer reaccionar un polímero con un grupo PEG que termina en una amina, mediante técnicas de polimerización por apertura de anillo (ROMP), o similares.

En una realización, el peso molecular de los polímeros se puede optimizar para un tratamiento eficaz como se divulga en el presente documento. Por ejemplo, el peso molecular de un polímero puede influir en la velocidad de degradación de las partículas (tal como cuando se puede ajustar el peso molecular de un polímero biodegradable), la solubilidad, la captación de agua y la cinética de liberación del fármaco. Por ejemplo, el peso molecular del polímero se puede

5 ajustar de manera que la partícula se biodegrade en el sujeto que se está tratando dentro de un periodo de tiempo razonable (que varía de unas pocas horas a 1-2 semanas, 3-4 semanas, 5-6 semanas, 7-8 semanas, etc.). Una partícula divulgada puede comprender, por ejemplo, un copolímero de dibloque de PEG y PL(G)A, en el que, por ejemplo, la porción de PEG puede tener un peso molecular promedio en número de aproximadamente 1.000-20.000, por ejemplo, aproximadamente 2.000-20.000, por ejemplo, de aproximadamente 2 a aproximadamente 10.000, y la

10 porción de PL(G)A puede tener un peso molecular promedio en número de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 20.000, o aproximadamente 5.000-100.000, por ejemplo, aproximadamente 20.000-70.000, por ejemplo, aproximadamente 15.000-50.000. Una nanopartícula terapéutica ilustrativa puede incluir de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 99 por ciento en peso de copolímero de poli(ácido láctico)-poli(etilenglicol) o copolímero de poli(ácido láctico)-co-poli(ácido glicólico)-poli(etilenglicol), o de aproximadamente el

15 20 a aproximadamente el 80 por ciento en peso, de aproximadamente el 40 a aproximadamente el 80 por ciento en peso, o de aproximadamente el 30 a aproximadamente el 50 por ciento en peso, o de aproximadamente el 70 a aproximadamente el 90 por ciento en peso de copolímero de poli(ácido láctico)-poli(etilenglicol) o copolímero de poli(ácido láctico)-copoli(ácido glicólico)-poli(etilenglicol). Los copolímeros de poli(ácido láctico)-poli(etilenglicol) ilustrativos pueden incluir un peso molecular promedio en número de aproximadamente 2 a aproximadamente 200 kDa de poli(ácido láctico) y un peso molecular promedio en número de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 10 kDa de poli(etilenglicol).

Las nanopartículas divulgadas pueden incluir opcionalmente de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 50 por ciento en peso de poli(ácido láctico) o poli(ácido láctico)-co-poli(ácido glicólico) (que no incluye PEG), o pueden incluir

25 opcionalmente de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 50 por ciento en peso, o de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 50 por ciento en peso o de aproximadamente el 30 a aproximadamente el 50 por ciento en peso de poli(ácido láctico) o poli(ácido láctico)-copoli(ácido glicólico). Por ejemplo, el poli(ácido láctico) o poli(ácido láctico)-co-poli(ácido glicólico) pueden tener un peso molecular promedio en número de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 kDa, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 12 kDa. El PLA ilustrativo puede tener un

30 peso molecular promedio en número de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 kDa. El PLGA ilustrativo puede tener un peso molecular promedio en número de aproximadamente 8 a aproximadamente 12 kDa.

En determinadas realizaciones, los polímeros de las nanopartículas se pueden conjugar con un lípido. El polímero puede ser, por ejemplo, un PEG terminado en lípidos. Como se describe a continuación, la porción lipídica del polímero se puede usar para el autoensamblaje con otro polímero, facilitando la formación de una nanopartícula. Por ejemplo,

35 un polímero hidrófilo podría conjugarse con un lípido que se autoensamblará con un polímero hidrófobo.

En algunas realizaciones, los lípidos son aceites. En general, cualquier aceite conocido en la técnica puede conjugarse con los polímeros usados en la invención. En algunas realizaciones, un aceite puede comprender uno o más grupos

40 de ácidos grasos o sales de los mismos. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede comprender hidrocarburos sustituidos o sin sustituir, de cadena larga (por ejemplo, C₈-C₅₀) digeribles. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede ser un ácido graso C₁₀-C₂₀ o una sal del mismo. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede ser un ácido graso C₁₅-C₂₀ o una sal del mismo. En algunas realizaciones, un ácido graso puede estar insaturado. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede estar monoinsaturado. En algunas realizaciones,

45 un grupo de ácido graso puede estar poliinsaturado. En algunas realizaciones, un doble enlace de un grupo de ácido graso insaturado puede estar en la conformación cis. En algunas realizaciones, un doble enlace de un ácido graso insaturado puede estar en conformación trans.

En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser uno o más de ácido butírico, caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, behénico o lignocérico. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser uno o más de ácido palmitoleico, oleico, vaccénico, linoleico, alfa-linolénico, gamma-linoleico, araquidónico, gadoleico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico o erúico.

Restos de direccionamiento

En el presente documento se proporcionan sistemas de administración dirigida basados en particulado específicos de estructura que comprenden nanopartículas que pueden incluir un resto de direccionamiento opcional, es decir, un

55 resto capaz de unirse o asociarse de otra manera con una entidad biológica, por ejemplo, un componente de membrana, un receptor de superficie celular, un antígeno de membrana específico de la próstata, o similares. Un resto de direccionamiento presente en la superficie de la nanopartícula puede permitir que la nanopartícula se localice en un sitio de direccionamiento particular, por ejemplo, un tumor, un sitio de enfermedad, un tejido, un órgano, un tipo de célula, etc. Como tal, la nanopartícula puede entonces ser "específica de la diana". El fármaco u otra carga útil o construcción génica puede liberarse, en algunos casos, de la partícula y permitir que interactúe localmente con el sitio de direccionamiento particular.

60

De acuerdo con la invención, una porción de direccionamiento puede hacer que las nanopartículas se localicen en un

tumor (por ejemplo, un tumor sólido), un sitio de enfermedad, un tejido, un órgano, un tipo de célula, etc. dentro del cuerpo de un sujeto, dependiendo del resto de direccionamiento utilizado. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal Fn14 puede localizarse en un receptor de superficie celular Fn14 en un tumor sólido, por ejemplo, tumor de glioblastoma o células cancerosas de glioblastoma. El sujeto puede ser un animal humano o no humano. Los ejemplos de sujetos incluyen, pero sin limitación, un mamífero tal como un perro, un gato, un caballo, un burro, un conejo, una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra, una rata, un ratón, una cobaya, un hámster, un primate, un ser humano, o similares.

Anticuerpos

Un resto de direccionamiento puede ser un anticuerpo, término que pretende incluir fragmentos de anticuerpos, porciones características de anticuerpos, y pueden identificarse restos de direccionamiento monocatenarios, por ejemplo, usando procedimientos tales como presentación en fagos. De acuerdo con la invención, una nanopartícula divulgada incluye un resto de direccionamiento que es un anticuerpo monoclonal Fn14, ITEM4, ITEM4-SH, ITEM4-scFv, o ITEM4 Fab. Se contemplan otros anticuerpos que están disponibles comercialmente (por ejemplo, ITEM1) para dirigirse a tumores positivos para Fn14 como se describe en Johnston, A.J., et al., "Targeting of Fn14 Prevents Cancer-Induced Cachexia and Prolongs Survival". Cell. 10 de septiembre de 2015;162(6):1365-78.

Los aminoácidos de un anticuerpo anti-Fn14 o su fragmento de unión a antígeno que interactúan con la proteína Fn14 preferentemente no están mutados (o, si mutan, se reemplazan por un residuo de aminoácido conservado). En una realización de una variante del anticuerpo ITEM4 o una variante de un anticuerpo ITEM4 no se cambia.

En una realización, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno no reacciona de forma cruzada con otros miembros de la familia TNF y TNFR. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo monovalente, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico), un anticuerpo multivalente, un fragmento F^A , un fragmento $F(A)_2$, un fragmento F_{ab} , un fragmento F_{sc} , o un fragmento F_v . Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento puede ser "multiespecífico", por ejemplo, biespecífico, trispecífico o de mayor multiespecificidad, lo que significa que reconoce y se une a dos o más epítopos diferentes presentes en uno o más antígenos diferentes (por ejemplo, proteínas) al mismo tiempo. Por lo tanto, si una molécula de unión es "monoespecífica" o "multiespecífica", por ejemplo, "biespecífica", se refiere al número de epítopos diferentes con los que reacciona la molécula de unión. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de una proteína Fn14, o pueden ser específicos para Fn14, así como para un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido.

Como se usa en el presente documento, el término "valente" (como se usa en "anticuerpo multivalente") se refiere al número de dominios de unión potenciales, por ejemplo, dominios de unión a antígeno, presentes en una molécula de unión. Cada dominio de unión se une específicamente a un epítipo. Cuando una molécula de unión comprende más de un dominio de unión, cada dominio de unión puede unirse específicamente al mismo epítipo (para un anticuerpo con dos dominios de unión, denominado "monoespecífico bivalente") o a diferentes epítopos (para un anticuerpo con dos dominios de unión, denominado "biespecífico bivalente"). Un anticuerpo también puede ser biespecífico y bivalente para cada especificidad (denominados "anticuerpos tetravalentes biespecíficos"). En otra realización, se pueden fabricar minicuerpos tetravalentes o anticuerpos con dominio eliminado. Los anticuerpos bivalentes biespecíficos y los métodos para fabricarlos se describen, por ejemplo, en las Pat. de EE.UU. N.º 5.731.168; 5.807.706; 5.821.333; y las Publicaciones de Solicitud de EE.UU. N.º 2003/020734 y 2002/015537. Se describen anticuerpos biespecíficos y tetravalentes y los métodos para producirlos, por ejemplo, en los documentos WO 02/096948 y WO 00/44788. Véanse, generalmente, las publicaciones PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; WO 2007/109254; las Patentes de Estados Unidos N.º 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; 5.601.819)

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-Fn14, por ejemplo, una o las dos cadenas pesadas del anticuerpo, se une a uno o más scFv para formar un anticuerpo biespecífico. En otras realizaciones, un anticuerpo anti-Fn14 está en forma de un scFv que está unido a un anticuerpo para formar una molécula biespecífica. Las construcciones de anticuerpo-scFv se describen, por ejemplo, en el documento WO 2007/109254.

Las cadenas pesada y ligera del anticuerpo pueden ser sustancialmente de longitud completa. La proteína puede incluir al menos una, y opcionalmente dos, cadenas pesadas completas, y al menos una, y opcionalmente dos, cadenas ligeras completas, o puede incluir un fragmento de unión a antígeno. En aún otras realizaciones, el anticuerpo tiene una región constante de cadena pesada elegida entre, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE. Normalmente, la región constante de cadena pesada es humana o una forma modificada de una región constante humana. En otra realización, el anticuerpo tiene una región constante de cadena ligera elegida entre, por ejemplo, kappa o lambda, particularmente, kappa (por ejemplo, kappa humana).

En determinadas realizaciones, la unión de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos da como resultado la reticulación o agrupamiento del receptor Fn14 en la superficie celular. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden formar un multímero, por ejemplo, uniéndose a la proteína A, o pueden ser multivalentes. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento se

puede modificar para mejorar la función efectora, por ejemplo, para mejorar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo o mejorar la reticulación del receptor diana/Fn14. Esto se puede conseguir introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Como alternativa, o adicionalmente, pueden introducirse uno o más residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una mayor destrucción celular mediada por complemento y citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC). También pueden prepararse también anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada utilizando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff y col. *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Como alternativa, puede diseñarse mediante ingeniería genética un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y puede de este modo potenciarse la lisis por el complemento y las capacidades de ADCC. Véase Stevenson et al. *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989). Además, se puede defucosilar un anticuerpo de manera que el anticuerpo modificado exhiba ADCC mejorada en comparación con la forma no defucosilada del anticuerpo. Véase, por ejemplo, el documento WO2006089232.

Esta divulgación incluye, pero sin limitación, ejemplos específicos de anticuerpos anti-Fn14, tales como ITEM4, ITEM4-SH o ITEM4-scFv o ITEM4 Fab. Pueden fabricarse anticuerpos particulares, tales como estos, por ejemplo, preparando y expresando genes sintéticos que codifican las secuencias de aminoácidos enumeradas o mutando genes de la línea germinal humana para proporcionar un gen que codifica las secuencias de aminoácidos enumeradas. Además, estos anticuerpos y otros anticuerpos anti-Fn14 (por ejemplo, anticuerpos) pueden producirse, por ejemplo, usando uno o más métodos. Se encuentran disponibles numerosos métodos para obtener anticuerpos, particularmente anticuerpos humanos. Un método ilustrativo incluye el cribado de bibliotecas de expresión de proteínas, por ejemplo, bibliotecas de presentación en fagos o ribosomas. La presentación de fagos se describe, por ejemplo, el documento US 5.223.409; Smith (1985) *Science* 228:1315-1317; los documentos WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; y WO 90/02809. La presentación de Fab en fagos se describe, por ejemplo, en las Pat. de EE.UU. N.º 5.658.727; 5.667.988; y 5.885.793. Además del uso de bibliotecas de presentación, se pueden usar otros métodos para obtener un anticuerpo de unión a Fn14. Por ejemplo, la proteína Fn14 o un péptido de la misma puede usarse como un antígeno en un animal no humano, por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón, hámster o rata. Además, las células transfectadas con un ADNc que codifica Fn14 se pueden inyectar en un animal no humano como un medio para producir anticuerpos que se unen eficazmente a la proteína Fn14 de superficie celular.

En una realización, el animal no humano incluye al menos una parte de un gen de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, es posible diseñar cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos de los loci de Ig humana. Usando la tecnología de hibridoma, se pueden producir y seleccionar anticuerpos monoclonales específicos de antígenos derivados de los genes con la especificidad deseada. Véanse, por ejemplo, XENOMOUSE™, Green et al. (1994) *Nature Genetics* 7:13-21, los documentos U.S. 2003-0070185, WO 96/34096, y WO 96/33735. En otra realización, se obtiene un anticuerpo monoclonal del animal no humano y a continuación se modifica, por ejemplo, se humaniza o desinmuniza. Winter describe un método de injerto de CDR ilustrativo que puede usarse para preparar anticuerpos humanizados descritos en el presente documento (documento U.S. 5.225.539). Todas o algunas de las CDR de un anticuerpo humano particular pueden reemplazarse con al menos una porción de un anticuerpo no humano. Puede que solo sea necesario reemplazar las CDR requeridas para la unión o los determinantes de unión de dichas CDR para llegar a un anticuerpo humanizado útil que se una a Fn14. Pueden generarse anticuerpos humanizados reemplazando secuencias de la región variable Fv que no están directamente implicadas en la unión a antígeno con secuencias equivalentes de regiones variables Fv humanas. Se proporcionan métodos generales para generar anticuerpos humanizados por Morrison, S. L. (1985) *Science* 229:1202-1207, por Oi et al. (1986) *BioTechniques* 4:214, y por los documentos US 5.585.089; US 5.693.761; US 5.693.762; US 5.859.205; y US 6.407.213. Los métodos incluyen aislar, manipular y expresar las secuencias de ácido nucleico que codifican la totalidad o parte de las regiones variables Fv de inmunoglobulina de al menos una de una cadena pesada o ligera. Las fuentes de dicho ácido nucleico son bien conocidas por los expertos en la técnica y, por ejemplo, pueden obtenerse de un hibridoma que produce un anticuerpo contra una diana predeterminada, como se ha descrito anteriormente, de genes de inmunoglobulina de línea germinal, o de construcciones sintéticas. A continuación, el ADN recombinante que codifica el anticuerpo humanizado puede clonarse en un vector de expresión apropiado.

Las secuencias de la línea germinal humana, por ejemplo, se divulgan en Tomlinson, LA. et al. (1992) *J Mol. Biol.* 227:776-798; Cook, G. P. et al. (1995) *Immunol. Today* 16: 237-242; Chothia, D. et al. (1992) *J Mol. Bio.* 227:799-817; y Tomlinson et al. (1995) *EMBO J* 14:4628-4638. El directorio V BASE proporciona un directorio exhaustivo de secuencias de región variable de inmunoglobulina humana (compilado por Tomlinson, LA. et al. MRC Center for Protein Engineering, Cambridge, RU). Estas secuencias se pueden usar como fuente de secuencia humana, por ejemplo, para regiones marco y CDR. También se pueden usar regiones marco humanas de consenso, por ejemplo, como se describe en la Pat. de EE.UU. N.º 6.300.064.

Un anticuerpo de unión a Fn14 no humano también puede modificarse mediante la eliminación específica de epítomos de linfocitos T humanas o "desinmunización" mediante los métodos divulgados en los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317. Brevemente, las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo pueden analizarse en busca de péptidos que se unan al MHC de Clase II; estos péptidos representan epítomos potenciales de linfocitos T (como se define en los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317). Para la detección de potenciales epítomos de

linfocitos T, se puede aplicar un enfoque de modelado informático denominado "enhebrado de péptidos" y, además, se puede buscar en una base de datos de péptidos de unión al MHC de clase II humanos los motivos presentes en las secuencias V_H y V_L, como se describe en los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317. Estos motivos se unen a cualquiera de los 18 principales alotipos DR de la clase II del MHC y, por lo tanto, constituyen potenciales epítomos de linfocitos T. Los potenciales epítomos de linfocitos T pueden eliminarse sustituyendo un pequeño número de residuos de aminoácido en las regiones variables, o preferentemente, mediante sustituciones de aminoácidos individuales. En la medida de lo posible, se realizan sustituciones conservadoras. A menudo, pero no exclusivamente, puede usarse un aminoácido común a una posición en las secuencias de anticuerpos de la línea germinal humana. Después de que se identifican los cambios desinmunizantes, los ácidos nucleicos que codifican V_H y V_L pueden construirse mediante mutagénesis u otros métodos de síntesis (por ejemplo, síntesis *de novo*, reemplazo de casetes, etc.). Una secuencia variable mutagenizada puede, opcionalmente, fusionarse a una región constante humana, por ejemplo, regiones constantes de IgG1 humana o kappa.

También se pueden usar otros métodos para humanizar anticuerpos. Por ejemplo, otros métodos pueden tener en cuenta la estructura tridimensional del anticuerpo, las posiciones marco que están en proximidad tridimensional de los determinantes de unión, y las secuencias peptídicas inmunógenas. Véanse, por ejemplo, el documento WO 90/07861; las Patentes de Estados Unidos N.º 5.693.762; 5.693.761; 5.585.089; 5.530.101; y 6.407.213; Tempest et al. (1991) Biotechnology 9:266-271. Otro método más se denomina "ingeniería genética humana" y se describe, por ejemplo, en el documento U.S. 2005-008625. El anticuerpo puede incluir una región Fc humana, por ejemplo, una región Fc de tipo silvestre o una región Fc que incluye una o más alteraciones. En una realización, la región constante se altera, por ejemplo, se muta, para modificar las propiedades del anticuerpo (por ejemplo, para aumentar o disminuir uno o más de: unión al receptor Fc, glucosilación de anticuerpos, el número de residuos de cisteína, función de la célula efectora, o función del complemento). Por ejemplo, la región constante de IgG1 humana puede mutar en uno o más residuos, por ejemplo, uno o más de los residuos 234 y 237. Los anticuerpos pueden tener mutaciones en la región CH2 de la cadena pesada que reducen o alteran la función efectora, por ejemplo, unión al receptor Fc y activación del complemento. Por ejemplo, los anticuerpos pueden tener mutaciones tales como las descritas en las Patentes de EE.UU. N.º 5.624.821 y 5.648.260. Los anticuerpos también pueden tener mutaciones que estabilizan el enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas de una inmunoglobulina, tales como mutaciones en la región bisagra de IgG4, como se divulga en la técnica (por ejemplo, Angal et al. (1993) MoL Immunol. 30:105-08). Véase también, por ejemplo, el documento U.S. 2005-0037000.

En una realización, un anticuerpo anti-Fn14 se modifica, por ejemplo, mediante mutagénesis, para proporcionar un grupo de anticuerpos modificados. A continuación, los anticuerpos modificados se evalúan para identificar uno o más anticuerpos que tienen propiedades funcionales alteradas (por ejemplo, unión mejorada, estabilidad mejorada, antigenicidad reducida o estabilidad aumentada *in vivo*). En una implementación, la tecnología de biblioteca de presentación se usa para seleccionar o cribar el grupo de anticuerpos modificados. A continuación, se identifican anticuerpos de mayor afinidad a partir de la segunda biblioteca, por ejemplo, utilizando una mayor rigurosidad o condiciones de unión y lavado más competitivas. También se pueden utilizar otras técnicas de cribado.

En algunas implementaciones, la mutagénesis se dirige a regiones conocidas o que probablemente estén en la interfaz de unión. Si, por ejemplo, las proteínas de unión identificadas son anticuerpos, entonces la mutagénesis puede dirigirse a las regiones CDR de las cadenas pesada o ligera como se describe en el presente documento. Además, la mutagénesis se puede dirigir a regiones marco cercanas o adyacentes a las CDR, por ejemplo, regiones marco, particularmente dentro de los 10, 5 o 3 aminoácidos de una unión CDR. En el caso de los anticuerpos, la mutagénesis también puede limitarse a una o algunas de las CDR, por ejemplo, para realizar mejoras escalonadas. En una realización, la mutagénesis se usa para hacer que un anticuerpo sea más similar a una o más secuencias de la línea germinal. Un método de línea germinal ilustrativo puede incluir: identificar una o más secuencias de línea germinal que son similares (por ejemplo, las más similares en una base de datos particular) a la secuencia del anticuerpo aislado. A continuación, se pueden realizar mutaciones (a nivel de aminoácidos) en el anticuerpo aislado, ya sea progresivamente, en combinación, o ambas. Por ejemplo, se crea una biblioteca de ácidos nucleicos que incluye secuencias que codifican algunas o todas las posibles mutaciones de la línea germinal. A continuación, se evalúan los anticuerpos mutados, por ejemplo, para identificar un anticuerpo que tiene uno o más residuos de línea germinal adicionales en relación con el anticuerpo aislado y que todavía es útil (por ejemplo, tiene una actividad funcional). En una realización, se introducen tantos residuos de la línea germinal en un anticuerpo aislado como sea posible.

En una realización, la mutagénesis se usa para sustituir o insertar uno o más residuos de la línea germinal en una región CDR. Por ejemplo, el residuo de CDR de la línea germinal puede ser de una secuencia de la línea germinal que es similar (por ejemplo, la más similar) a la región variable que se está modificando. Después de la mutagénesis, se puede evaluar la actividad (por ejemplo, unión u otra actividad funcional) del anticuerpo para determinar si el residuo o residuos de la línea germinal son tolerados. Se puede realizar una mutagénesis similar en las regiones marco.

La selección de una secuencia de línea germinal se puede realizar de diferentes formas. Por ejemplo, se puede seleccionar una secuencia de línea germinal si cumple con un criterio predeterminado de selectividad o similitud, por ejemplo, al menos un cierto porcentaje de identidad, por ejemplo, al menos un 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o un 99,5 % de identidad, con respecto al anticuerpo no humano donante. La selección se puede realizar usando al menos 2, 3, 5 o 10 secuencias de línea germinal. En el caso de CDR1 y CDR2, identificar una secuencia

de línea germinal similar puede incluir seleccionar una de dichas secuencias. En el caso de CDR3, identificar una secuencia de línea germinal similar puede incluir seleccionar una de dichas secuencias, pero puede incluir el uso de dos secuencias de línea germinal que contribuyen por separado a la porción amino-terminal y la porción carboxi-terminal. En otras implementaciones, se utilizan más de una o dos secuencias de la línea germinal, por ejemplo, para formar una secuencia consenso.

En otras realizaciones, el anticuerpo puede modificarse para que tenga un patrón de glucosilación alterado (es decir, alterado del patrón de glucosilación original o nativo). Como se usa en este contexto, "alterado" significa tener uno o más restos de hidratos de carbono eliminados, y/o tener uno o más sitios de glucosilación añadidos al anticuerpo original. La adición de sitios de glucosilación a los presentes anticuerpos divulgados puede lograrse alterando la secuencia de aminoácidos para que contenga secuencias consenso del sitio de glucosilación; dichas técnicas se conocen bien en la técnica. Otro medio para aumentar el número de restos de hidratos de carbono en los anticuerpos es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos a los residuos de aminoácidos del anticuerpo. Estos métodos se describen en, por ejemplo, el documento WO 87/05330, y Aplin y Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem. 22:259-306. La eliminación de cualquier resto de hidrato de carbono presente en los anticuerpos se puede lograr química o enzimáticamente como se describe en la técnica (Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52; Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131; y Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350). Véase, por ejemplo, la Pat. de EE.UU. N.º 5.869.046 para una modificación que aumenta la semivida *in vivo* proporcionando un epítipo de unión al receptor de rescate.

En una realización, un anticuerpo tiene secuencias CDR que difieren solo insustancialmente de las descritas. Las diferencias insustanciales incluyen cambios menores de aminoácidos, tales como sustituciones de 1 o 2 de cualquiera de los normalmente 5-7 aminoácidos en la secuencia de una CDR, por ejemplo, una CDR Chothia o Kabat. Normalmente, un aminoácido se sustituye por un aminoácido relacionado que tiene características de carga, hidrófobas o estereoquímicas similares. Dichas sustituciones estarían dentro de las habilidades ordinarias de un experto. A diferencia de las CDR, se pueden realizar cambios más sustanciales en las regiones marco (FR) de estructura sin afectar negativamente a las propiedades de unión de un anticuerpo. Los cambios en las FR incluyen, pero sin limitación, humanizar un marco no derivado de humano o diseñar determinados residuos marco que son importantes para el contacto con antígenos o para estabilizar el sitio de unión, por ejemplo, cambiar la clase o subclase de la región constante, cambiar los residuos de aminoácidos específicos que podrían alterar una función efectora, tal como la unión al receptor Fc (Lund et al. (1991) J Immun. 147:2657-62; Morgan et al. (1995) Immunology 86: 319-24), o cambiar la especie de la que se deriva la región constante. Los anticuerpos anti-Fn14 pueden estar en forma de anticuerpos de longitud completa o en forma de fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, fragmentos Fab, F(ab')₂, Fd, dAb, y scFv. Un fragmento de un anticuerpo puede ser un fragmento de unión a antígeno, tal como una región variable, por ejemplo, VH o VL. Las formas adicionales incluyen una proteína que incluye un solo dominio variable, por ejemplo, un dominio de camello o camelizado. Véanse, por ejemplo, el documento U.S. 2005-0079574 y Davies et al. (1996) Protein Eng. 9(6):531-7.

Los restos de direccionamiento divulgados en el presente documento se conjugan normalmente con un polímero o copolímero divulgado (por ejemplo, PLA-PEG), y tal conjugado polimérico puede formar parte de una nanopartícula divulgada. Por ejemplo, una nanopartícula terapéutica divulgada puede incluir opcionalmente de aproximadamente el 0,2 a aproximadamente el 10 por ciento en peso de un PLA-PEG o PLGA-PEG, en la que el PEG está funcionalizado con un ligando de direccionamiento (por ejemplo, anticuerpo monoclonal PLA-Fn14). Tal ligando de direccionamiento puede, en algunas realizaciones, unirse covalentemente al PEG, por ejemplo, unirse al PEG mediante un enlazador metoxi-PEG5k-amina mediante la química de carbodiimida de EDC.

Nanopartículas

Las nanopartículas divulgadas pueden tener una configuración sustancialmente esférica (es decir, las partículas generalmente parecen ser esféricas), o no esférica. Por ejemplo, las partículas, al hincharse o contraerse, pueden adoptar una configuración no esférica. En algunos casos, las partículas pueden incluir mezclas poliméricas. Por ejemplo, se puede formar una mezcla polimérica que incluye un primer polímero que comprende un resto de direccionamiento y un polímero biocompatible, y un segundo polímero que comprende un polímero biocompatible pero que no comprende el resto de direccionamiento. Controlando la relación del primer y segundo polímeros en el polímero final, la concentración y la ubicación del resto de direccionamiento en el polímero final pueden controlarse fácilmente en cualquier grado adecuado.

Las nanopartículas divulgadas pueden tener un diámetro característico de 120 nm, 130 nm, 140 nm, 150 nm, 160 nm, 170 nm, 180 nm o 190 nm.

En un conjunto de realizaciones, las partículas pueden tener un interior y una superficie, donde la superficie tiene una composición diferente a la del interior, es decir, puede haber al menos un compuesto presente en el interior pero no presente en la superficie (o viceversa), y/o al menos un compuesto está presente en el interior y en la superficie a diferentes concentraciones. Por ejemplo, en una realización, un compuesto, tal como un resto de direccionamiento de un conjugado polimérico de la presente invención, puede estar presente tanto en el interior como en la superficie de la partícula, pero a una concentración más alta en la superficie que en el interior de la partícula, aunque en algunos

casos, la concentración en el interior de la partícula puede ser esencialmente distinta de cero, es decir, hay una cantidad detectable del compuesto presente en el interior de la partícula. En algunos casos, el interior de la partícula es más hidrófobo que la superficie de la partícula. Por ejemplo, el interior de la partícula puede ser relativamente hidrófobo con respecto a la superficie de la partícula, y un fármaco, u otra carga útil, puede ser hidrófobo y se asocia fácilmente con el centro relativamente hidrófobo de la partícula. Por lo tanto, el fármaco, u otra carga útil, puede estar contenida en el interior de la partícula, que puede protegerla del entorno externo que rodea a la partícula (o viceversa). Por ejemplo, un fármaco, u otra carga útil, contenido en una partícula administrada a un sujeto se protegerá del cuerpo de un sujeto y el cuerpo también se aislará del fármaco. En determinadas realizaciones, las partículas poliméricas tienen más de un polímero o macromolécula presente y bibliotecas que involucran dichos polímeros o macromoléculas.

Por ejemplo, en un conjunto de realizaciones, las partículas pueden contener más de un polímero distinguible (por ejemplo, copolímeros, por ejemplo, copolímeros de bloque), y las relaciones de los dos (o más) polímeros pueden controlarse independientemente, lo que permite el control de las propiedades de la partícula. Por ejemplo, un primer polímero puede ser un conjugado polimérico que comprende un resto de direccionamiento y una porción biocompatible, y un segundo polímero puede comprender una porción biocompatible pero no contener el resto de direccionamiento, o el segundo polímero puede contener una porción biocompatible distinguible del primer polímero. Por lo tanto, el control de las cantidades de estos polímeros dentro de la partícula polimérica se puede usar para controlar diversas propiedades físicas, biológicas o químicas de la partícula, por ejemplo, el tamaño de la partícula (por ejemplo, variando los pesos moleculares de uno o ambos polímeros), la carga superficial (por ejemplo, controlando las relaciones de los polímeros si los polímeros tienen cargas o grupos terminales diferentes), la hidrofiliidad superficial (por ejemplo, si los polímeros tienen pesos moleculares y/o hidrofiliidades diferentes), la densidad superficial del resto de direccionamiento (por ejemplo, controlando las relaciones de los dos o más polímeros), etc.

Como ejemplo específico, una partícula puede comprender un primer polímero que comprende una primera porción biocompatible y un resto de direccionamiento, y un segundo polímero que comprende una segunda porción biocompatible diferente de la primera porción biocompatible (por ejemplo, que tiene una composición diferente, un número de unidades repetidas sustancialmente diferente, etc.) y el resto de direccionamiento. Como ejemplo adicional, un primer polímero puede comprender una porción biocompatible y un primer resto de direccionamiento, y un segundo polímero puede comprender una porción biocompatible y un segundo resto de direccionamiento diferente del primer resto de direccionamiento. Por ejemplo, en el presente documento se divulga una nanopartícula polimérica terapéutica capaz de unirse a una diana, que comprende un primer polímero no funcionalizado; un segundo polímero no funcionalizado opcional; un polímero funcionalizado que comprende un resto de direccionamiento; y un agente terapéuticamente activo; en la que dicha nanopartícula comprende de aproximadamente 15 a aproximadamente 300 moléculas de polímero funcionalizado, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 200 moléculas, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 100 moléculas de polímero funcionalizado.

En una realización particular, el polímero de la primera o segunda macromoléculas de la nanopartícula de la invención es PLA, PLGA o PEG, o copolímeros de los mismos. En una realización específica, el polímero de la primera macromolécula es un copolímero de PLGA-PEG, y la segunda macromolécula es un copolímero de PLGA-PEG, o un copolímero de PLA-PEG. Por ejemplo, una nanopartícula ilustrativa puede tener una corona de PEG con una densidad de aproximadamente 0,065 g/cm³, o de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,10 g/cm³. Las nanopartículas divulgadas pueden ser estables (por ejemplo, conservar sustancialmente todos los agentes biológicamente activos), por ejemplo, en una solución que puede contener un sacárido, durante al menos aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días o al menos aproximadamente 5 días a temperatura ambiente o a 25 °C.

En algunas realizaciones, las nanopartículas divulgadas también pueden incluir un alcohol graso, que puede aumentar la velocidad de liberación del fármaco. Por ejemplo, las nanopartículas divulgadas pueden incluir un alcohol C₈-C₃₀ tal como alcohol cetílico, octanol, alcohol estearílico, alcohol araquidílico, docosonal u octasonal. Las nanopartículas pueden tener propiedades de liberación controlada, por ejemplo, pueden ser capaces de administrar una cantidad de agente biológicamente activo a un paciente, por ejemplo, a un sitio específico en un paciente, durante un periodo de tiempo prolongado, por ejemplo, más de 1 día, 1 semana o más. En algunas realizaciones, las nanopartículas divulgadas liberan sustancialmente inmediatamente (por ejemplo, durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 30 minutos) menos de aproximadamente el 2 %, menos de aproximadamente el 5 %, o menos de aproximadamente el 10 % de un agente biológicamente activo (por ejemplo, un agente terapéutico tal como taxano), por ejemplo, cuando se pone en una solución de tampón fosfato a temperatura ambiente y/o a 37 °C.

Por ejemplo, las nanopartículas divulgadas que incluyen un agente biológicamente activo, pueden, en algunas realizaciones, liberar el agente biológicamente activo cuando se ponen en una solución acuosa, por ejemplo, a 25 °C con una velocidad sustancialmente correspondiente a a) de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 20 % del agente biológicamente activo total se libera después de aproximadamente 1 hora; b) de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 60 % del agente biológicamente activo se libera después de aproximadamente 8 horas; c) de aproximadamente el 30 a aproximadamente el 80 % del agente biológicamente activo total se libera después de aproximadamente 12 horas; y d) no menos de aproximadamente el 75 % del total se libera después de aproximadamente 24 horas.

En algunas realizaciones, después de la administración a un sujeto o paciente de una nanopartícula divulgada o una

composición que incluye una nanopartícula divulgada, la concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) del agente biológicamente activo en el paciente es sustancialmente mayor en comparación con una $C_{m\acute{a}x}$ del agente biológicamente activo si se administra en solitario (por ejemplo, no como parte de una nanopartícula).

- 5 En otra realización, una nanopartícula divulgada que incluye un agente biológicamente activo, cuando se administra a un sujeto, puede tener un $t_{m\acute{a}x}$ de agente biológicamente activo sustancialmente más largo en comparación con un $t_{m\acute{a}x}$ del agente biológicamente activo administrado en solitario. Como ejemplo específico, la nanopartícula puede contener polímeros que incluyen un polímero biocompatible relativamente hidrófobo y un resto de direccionamiento relativamente hidrófilo, de modo que, durante la formación de la nanopartícula, una mayor concentración del resto de
10 direccionamiento hidrófilo se expone en la superficie y una mayor concentración del polímero biocompatible hidrófobo está presente en el interior de la partícula.

En algunas realizaciones, el polímero biocompatible es un polímero hidrófobo. Los ejemplos no limitantes de polímeros biocompatibles incluyen polilactida, poliglicolida y/o poli(lactida-co-glicolida). En una realización distinta, esta
15 divulgación proporciona una nanopartícula que comprende 1) una matriz polimérica; 2) opcionalmente, un compuesto o capa anfílica que rodea o se dispersa dentro de la matriz polimérica formando una cubierta continua o discontinua para la partícula; 3) un polímero no funcionalizado que puede formar parte de la matriz polimérica, y 4) un ligando de PSMA de bajo peso molecular unido covalentemente a un polímero, que puede formar parte de la matriz polimérica. Por ejemplo, una capa anfílica puede reducir la penetración de agua en la nanopartícula, mejorando así la eficacia de encapsulación del fármaco y ralentizando la liberación del fármaco. Como se usa en el presente documento, el término "anfílico" se refiere a una propiedad en la que una molécula tiene tanto una parte polar como una parte no polar. A menudo, un compuesto anfílico tiene una cabeza polar unida a una larga cola hidrófoba. En algunas realizaciones, la porción polar es soluble en agua, mientras que la porción no polar es insoluble en agua. Además, la porción polar puede tener una carga positiva formal o una carga negativa formal. Como alternativa, la porción polar puede tener una
20 carga formal tanto positiva como negativa, y ser un zwitterión o sal interna. Para los fines de la invención, el compuesto anfílico puede ser, pero sin limitación, uno o una pluralidad de los siguientes: lípidos derivados de forma natural, tensioactivos, o compuestos sintetizados con restos tanto hidrófilos como hidrófobos. Ejemplos específicos de compuestos anfílicos incluyen, pero sin limitación, fosfolípidos, tales como 1,2 distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), distearoilfosfatidilcolina (DSPC), diarquidilfosfatidilcolina (DAPC),
25 dibehenoilfosfatidilcolina (DBPC), ditricosanoilfosfatidilcolina (DTPC), y dilignoceroilfosfatidilcolina (DLPC), incorporadas en una relación de entre 0,01-60 (peso de lípido/p de polímero), más preferentemente entre 0,1-30 (peso de lípido/p de polímero). Los fosfolípidos que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, ácidos fosfatídicos, fosfatidil colinas con lípidos tanto saturados como insaturados, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilgliceroles, fosfatidilserinas, fosfatidilinositoles, derivados de lisofosfatidilo, cardiolipina, y .beta.-acil-y-alquil fosfolípidos. Ejemplos de fosfolípidos
30 incluyen, pero sin limitación, fosfatidilcolinas tales como dioleoilfosfatidilcolina, dimiristoil fosfatidilcolina, ipentadecanoilfosfatidilcolina, dilauroilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), distearoilfosfatidilcolina (DSPC), iaraquidilfosfatidilcolina (DAPC), dibehenoilfosfatidilcolina (DBPC), itricosanoilfosfatidilcolina (DTPC), dilignoceroilfosfatidilcolina (DLPC); y fosfatidiletanolaminas tales como dioleoilfosfatidiletanolamina o 1-hexadecil-2-
35 almitoilglicerofosfoetanolamina.

40 También se pueden usar fosfolípidos sintéticos con cadenas acilo asimétricas (por ejemplo, con una cadena acilo de 6 carbonos y otra cadena acilo de 12 carbonos). En una realización particular, un componente anfílico que se puede utilizar para formar una capa anfílica es la lecitina y, en particular, fosfatidilcolina. La lecitina es un lípido anfílico y, como tal, forma una bicapa fosfolipídica que tiene las cabezas hidrófilas (polares) mirando hacia su entorno, que a menudo son acuosas, y las colas hidrófobas enfrentadas entre sí. La lecitina tiene la ventaja de ser un lípido natural que está disponible, por ejemplo, en la soja, y ya cuenta con la aprobación de la FDA para su uso en otros dispositivos de administración. Además, una mezcla de lípidos, tal como la lecitina, es más ventajosa que un solo lípido puro. En determinadas realizaciones, una nanopartícula divulgada tiene una monocapa anfílica, lo que significa que la capa no es una bicapa fosfolipídica, sino que existe como una única capa continua o discontinua alrededor o dentro de la nanopartícula. La capa anfílica está "asociada con" la nanopartícula de la invención, lo que significa que está
45 posicionada en cierta proximidad a la matriz polimérica, tal como rodeando el exterior de la cubierta polimérica, o dispersa dentro de los polímeros que forman la nanopartícula.

50 La densidad del PEG, el tipo y/o densidad de la molécula de direccionamiento, y el tipo de polímero se pueden alterar en determinadas realizaciones para optimizar la unión a Fn14. La Tabla 1 es un ejemplo de un resumen de las variables de formulación para la síntesis y el cribado de BPN dirigidas a Fn14.

Tabla 1.

Polímeros	Productos terapéuticos	Molécula de direccionamiento	Variables de formulación	Métodos de caracterización
PLGA (50:50) PLGA (75:25) PLA PGA PAA	Cisplatino Doxorrubicina Etopósido Paclitaxel Fármacos de molécula pequeña Inhibidores de la ruta	ITEM4 ITEM4 scFv ITEM4 Fab TWEAK	Composición de la mezcla polimérica PEG PM (2 kDa, 5 kDa, 10 kDa) Densidad superficial de PEG (relación PEG con respecto a polímero) Densidad de la molécula de direccionamiento	Dispersión de luz dinámica (tamaño, potencial ζ) Microscopía electrónica (morfología) Ensayos de RMN y proteínas (cuantificación de la densidad del PEG y densidad de la molécula de direccionamiento) Unión de partículas de resonancia de plasmón superficial a Fn14 y ECM cerebral)

Preparación de nanopartículas

- 5 Otro aspecto de esta divulgación está dirigido a métodos para preparar las nanopartículas divulgadas. En algunas realizaciones, las partículas de poliestireno (PS) modificado con COOH rojo fluorescente de 40 nm a 200 nm se modificaron covalentemente con metoxi (MeO)-PEG-amina (NH₂) (5 kDa de PM) mediante la reacción de carboxilamina, siguiendo un protocolo modificado previamente descrito [32-33]. Estos dos protocolos se combinaron y se optimizaron para obtener recubrimientos densos de PEG, un potencial ξ casi neutro y un PDI bajo para partículas
- 10 de PS de 40 nm-200 nm. En realizaciones para formular nanopartículas recubiertas penetrantes del tejido cerebral, se modificaron covalentemente nanopartículas de poliestireno modificado con carboxilato (PS-COOH) de 100 nm con metoxi-PEG5k-amina mediante química de carbodiimida de EDC, siguiendo un protocolo modificado descrito previamente [33-34]. En otras realizaciones, se prepararon nanopartículas recubiertas de -ITEM4 usando una
- 15 proporción diferente de PEG (metoxi-PEG5k-amina con respecto a maleimida-PEG5k-amina) para la PEGilación inicial de partículas; específicamente, se usó el 10 % en moles y el 50 % en moles de maleimida-PEG5k-amina para nanopartículas CNP-ITEM4 (baja) y CNP-ITEM4 (alta), respectivamente. ITEM 4-SH se conjugó sobre la superficie de las nanopartículas que contenían PEG funcionalizado con maleimida mediante la química de maleimida-tiol.

Agentes terapéuticamente activos

- 20 De acuerdo con la presente invención, cualquier agente terapéuticamente activo que incluya, por ejemplo, agentes terapéuticos (agentes anticancerosos, agentes anti-AD, agentes anti-PD, agentes anti-HD, agentes anti-epilepsia) y/o agentes de terapia génica (por ejemplo, ácidos nucleicos tales como ARN y ADN) puede administrarse mediante las nanopartículas divulgadas. Los ejemplos de agentes terapéuticamente activos a administrar de acuerdo con la
- 25 presente invención incluyen, pero sin limitación, fármacos, moléculas pequeñas (por ejemplo, agentes citotóxicos), ácidos nucleicos (por ejemplo, agentes de ADN, ARN, ARNip, ARNi y microARN), proteínas (por ejemplo, anticuerpos), péptidos, lípidos, hidratos de carbono, hormonas, metales, elementos y compuestos radiactivos, vacunas, agentes inmunológicos, etc., y/o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, la nanopartícula tiene una capacidad de carga del 1 % al 100 % para el agente terapéuticamente activo. En algunas realizaciones, el agente
- 30 terapéutico a administrar es un fármaco útil en el tratamiento del cáncer (por ejemplo, cáncer de cerebro, específicamente glioblastoma).

- De acuerdo con la invención, el resto de direccionamiento puede dirigirse a o hacer que la nanopartícula se localice en porciones específicas dentro de un sujeto, y la carga útil puede administrarse a esas porciones. En una realización
- 35 particular, el fármaco u otra carga útil se puede liberar de una manera de liberación controlada desde la partícula y se permite que interactúe localmente con el sitio de direccionamiento particular (por ejemplo, un tumor). El término "liberación controlada" (y variantes de ese término), como se usa en el presente documento (por ejemplo, en el contexto de "sistema de liberación controlada") generalmente pretende incluir la liberación de una sustancia (por ejemplo, un fármaco) en un sitio seleccionado o controlable de otra manera en velocidad, intervalo y/o cantidad. La
- 40 liberación controlada incluye, pero no se limita necesariamente a, administración sustancialmente continua, administración con patrón (por ejemplo, administración intermitente durante un periodo de tiempo interrumpido por intervalos de tiempo regulares o irregulares), y administración de un bolo de una sustancia seleccionada (por ejemplo, como una cantidad discreta predeterminada si se trata de una sustancia durante un periodo de tiempo relativamente

corto (por ejemplo, unos pocos segundos o minutos)).

El agente biológicamente activo puede ser un agente terapéutico tal como un taxano tal como paclitaxel (o sus derivados tal como DHA-paclitaxel o PG-paclitaxel) o docetaxel. En un conjunto de realizaciones, la carga útil es un fármaco o una combinación de más de un fármaco. Dichas partículas pueden ser útiles, por ejemplo, en realizaciones en las que se usa un resto de direccionamiento para dirigir una partícula que contiene un fármaco a una ubicación localizada particular en un sujeto, por ejemplo, para permitir que se produzca la administración localizada del fármaco. Por ejemplo, las NP biodegradables pueden estar compuestas por copolímeros de bloque de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y PEG y cargados con el 2,5 % en peso de paclitaxel. Los agentes terapéuticos ilustrativos incluyen agentes quimioterapéuticos doxorubicina (adriamicina), gemcitabina (gemzar), daunorrubicina, procarbazona, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, venorelbina, 5-fluorouracilo (5-FU), alcaloides de la vinca tales como vinblastina o vincristina; bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleucina, asparaginasa, busulfano, carboplatino, cladribina, camptotecina, CPT-11, 10-hidroxi-7-etilcamptotecina (SN38), dacarbazina, S-I capecitabina, florafur, 5'desoxifluorouridina, UFT, eniluracilo, desoxicidina, 5-azacitidina, 5-azadesoxicitidina, alopurinol, 2-cloroadenosina, trimetrexato, aminopterina, metilen-10-deazaminopterina (MDAM), oxaplatino, picoplatino, tetraplatino, satraplatino, platino-DACH, ormaplatino, CI-973, JM-216 y análogos de los mismos, epirubicina, fosfato de etopósido, 9-aminocamptotecina, 10,11-metilendioxicamptotecina, karenitecina, 9-nitrocamptotecina, TAS 103, vindesina, mostaza de L-fenilalanina, ifosfamida, mafosfamida, perfosfamida, trofosfamida carmustina, semustina, epotilonas A-E, tomudex, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, amsacrina, fosfato de etopósido, karenitecina, aciclovir, valaciclovir, ganciclovir, amantadina, rimantadina, lamivudina, zidovudina, bevacizumab, trastuzumab, rituximab, 5-fluorouracilo, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitantes de fármacos potencialmente adecuados incluyen agentes anticancerosos, incluyendo, por ejemplo, docetaxel, mitoxantrona y clorhidrato de mitoxantrona.

En otra realización, la carga útil puede ser un fármaco anticanceroso tal como 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3, 4-ipomeanol, 5-etiniluracilo, 9-dihidrotaxol, abiraterona, acivicina, aclarrubicina, clorhidrato de acodazol, acronina, acilfilveno, adecipenol, adozelesina, aldesleucina, todos los antagonistas de tk, altretamina, ambamustina, ambomicina, acetato de ametantrona, amidox, amifostina, aminoglutetimida, ácido aminolevulínico, amrubicina, amsacrina, anagrelida, anastrozol, andrografolida, inhibidores de la angiogénesis, antagonista D, antagonista G, antarelix, antramizina, anti-proteína morfogenética dorsalizante 1, antiestrógenos, antineoplastón, oligonucleótidos antisentido, afidicolina glicinato, moduladores génicos de la apoptosis, reguladores de la apoptosis, ácido apurínico, ARA-CDP-DLPTBA, arginina desaminasa, asparaginasa, asperlina, asulacrina, atamestano, atrimustina, axinastatina 1, axinastatina 2, axinastatina 3, azacitidina, azasetrón, azatoxina, azatirosina, azetepa, azotomicina, derivados de baccatina III, balanol, batimastat, benzoclorinas, benzodepa, benzoilestaurosoprina, derivados de beta lactama, beta-aletina, betaclamicina B, ácido betulínico, inhibidor de BFGF, bicalutamida, bisantreno, clorhidrato de bisantreno, bisazuidinilespermina, bisnafida, dimesilato de bisnafida, bistrateno A, bizelesina, bleomicina, sulfato de bleomicina, antagonistas de BRC/ABL, breflato, brequinar sódico, bropirimina, budotitano, busulfano, butionina sulfóxima, cactinomicina, calcipotriol, calfofina C, calusterona, derivados de camptotecina, IL-2 de viruela del canario, capecitabina, caracemida, carbetimer, carboplatino, carboxamida-amino-triazol, carboxiamidotriazol, carest M3, carmustina, earn 700, inhibidor derivado de cartilago, clorhidrato de carubicina, carzelesina, inhibidores de caseína cinasa, castanospermina, cecropina B, cedefingol, cetorelix, clorambucilo, clorinas, cloroquinaxalina sulfonamida, cicaprost, cirolemicina, cisplatino, cis-porfirina, cladribina, análogos de clomifeno, clotrimazol, colismidina A, colismicina B, combretastatina A4, análogo de combretastatina, conagenina, crambescidina 816, crisnatol, mesilato de crisnatol, criptoficina 8, derivados de criptoficina A, curacina A, ciclopentantraquinonas, ciclofosfamida, cicloplam, cipemicina, citarabina, ocfosfato de citarabina, factor citolítico, citostatina, dacarbazina, dacliximab, dactinomicina, clorhidrato de daunorrubicina, decitabina, deshiodrodidemnina B, deslorelinea, dexifosfamida, dexormaplatino, dexrazoxano, dexverapamilo, dezaguanina, mesilato de dezaguanina, diazicuona, didemnina B, didox, dietilhiotespermina, dihidro-5-azacitidina, dioxamicina, difenil espiromustina, docetaxel, docosanol, dolasetrón, doxifluridina, doxorubicina, clorhidrato de doxorubicina, droloxifeno, citrato de droloxifeno, propionato de dromostanolona, dronabinol, duazomicina, duocanicina SA, ebselen, ecomustina, edatrexato, edelfosina, edrecolomab, eflomitina, clorhidrato de eflomitina, elemeno, elarnitruclina, emitefur, enloplatino, enpromato, epipropidina, epirubicina, clorhidrato de epirubicina, epristerida, erbulozol, sistema vector de terapia génica de eritrocitos, clorhidrato de esorubicina, estramustina, análogo de estramustina, fosfato sódico de estramustina, agonistas de estrógenos, antagonistas de estrógenos, etanidazol, etopósido, fosfato de etopósido, etoprina, exemestano, fadrozol, clorhidrato de fadrozol, fazarabina, fenretinida, filgrastim, finasterida, flavopiridol, flezelastina, floxuridina, fluasterona, fludarabina, fosfato de fludarabina, clorhidrato de fluorodaunorrubicina, fluorouracilo, fluorocitabina, forfenimex, formestano, fosquidona, fostriecina, fostriecina sódica, fotemustina, gadolinio texafirina, nitrato de galio, galocitabina, ganirelix, inhibidores de gelatinasa, gemcitabina, clorhidrato de gemcitabina, inhibidores de glutatión, hepsulfam, herregulina, hexametileno-bisacetamida, hidroxiurea, hipericina, ácido ibandrónico, idarrubicina, clorhidrato de idarrubicina, idoxifeno, idramantona, ifosfamida, ihnofosina, ilomastat, imidazoacridonas, imiquimod, péptidos inmunoestimulantes, inhibidor del receptor del factor de crecimiento insulínico 1, agonistas de interferón, interferón alfa-2A, interferón alfa-2B, interferón alfa-N1, interferón alfa-N3, interferón beta-1A, interferón gamma-1B, interferones, interleucinas, iobenguano, yodoxorrubicina, iproplam, irinotecán, clorhidrato de irinotecán, iroplact, irsogladina, isobengazol, isohomohalicondrina B, itasetrón, jasplakinolida, kahalalida F, lamelarina-N triacetato, lanreotida, acetato de lanreotida, leinamicina, lenograstim, sulfato de lentinano, leptostatina, letrozol, factor inhibidor de leucemia, interferón alfa de leucocitos, acetato de leuprolido, leuprolida/estrógeno/progesterona, leuporelina, levamisol, liarozol, clorhidrato de liarozol, análogo de poliamina lineal, péptido de disacárido lipófilo,

compuestos de platino lipófilos, lisoclinamida, lobaplatino, lombricina, lometrexol, lometrexol sódico, lomustina, lonidamina, losoxantrona, clorhidrato de losoxantrona, lovastatina, loxoribina, lurtotecán, texafirina lisofilina de luteo, péptidos líticos, maitansina, manostatina A, marimastat, masoprocol, maspina, inhibidores de matrilisina, inhibidores de metaloproteinasa de matriz, maitansina, clorhidrato de mecloretamina, acetato de megestrol, acetato de melengestrol, melfalán, menogaril, merbarona, mercaptopurina, meterelina, metioninasa, metotrexato, metotrexato sódico, metoclopramida, metoprina, meturedepa, inhibidores de proteína cinasa C de microalgas, inhibidor de MIF, mifepristona, miltefosina, mirimostim, ARN bicatenario desemparejado, mitindomida, mitomarcina, mitocromina, mitogilina, mitoguazona, mitolactol, mitomalcina, mitomicina, análogos de mitomicina, mitonafida, mitosper, mitotano, mitotoxina factor de crecimiento de fibroblastos-saporina, mitoxantrona, clorhidrato de mitoxantrona, mofaroteno, molgramostim, anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana, lípido A de monofosforilo/SK de la pared celular de Mycobacterium, mopidamol, inhibidor del gen de resistencia a múltiples fármacos, terapia a base de supresor de múltiples tumores-1, agente anticanceroso de mostaza, micaperóxido B, extracto de pared celular micobacteriana, ácido micofenólico, miriaporona, N-acetildinalina, nafarelina, nagrestip, naloxona/pentazocina, napavina, nafterpina, nartograstim, nedaplatino, nemorubicina, ácido neridróico, endopeptidasa neutra, nilutamida, nisamicina, moduladores de óxido nítrico, antioxidante de nitrógeno, nitrulina, nocodazol, nogalamina, benzamidas N-sustituidas, O6-bencilguanina, octreotida, okicenona, oligonucleótidos, onapristona, ondansetrón, oracina, inductor de citocina oral, ormaplatino, osaterona, oxaliplatino, oxaunomicina, oxisuran, paclitaxel, análogos de paclitaxel, derivados de paclitaxel, palauamina, palmitoilrizoxina, ácido pamidróico, panaxitriol, panomifeno, parabactina, pazelitina, pegaspargasa, peldesina, peliomicina, pentamustina, polisulfato sódico de pentosano, pentostatina, pentozol, sulfato de peplomicina, perflubron, perfosfamida, alcohol perillico, fenazinomicina, fenilacetato, inhibidores de fosfatasa, picibanilo, clorhidrato de pilocarpina, pipobromano, piposulfan, pirarrubicina, piritrexim, clorhidrato de piroxantrona, placetina A, placetina B, inhibidor activador del plasminógeno, complejo de platino, compuestos de platino, complejo de platino-triamina, plicamicina, plomestano, porfímero sódico, porfiromicina, prednimustina, clorhidrato de procarbazona, propil-bis-acridona, prostaglandina J2, antiandrógeno de carcinoma de próstata, inhibidores de proteasoma, inmunomodulador basado en proteína A, inhibidor de la proteína cinasa C, inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa, inhibidores de fosforilasa de nucleósido de purina, puromicina, clorhidrato de puromicina, purpurinas, pirazorurina, pirazoloacridina, conjugado de polioxietileno-hemoglobina piridoxilada, antagonistas de RAF, raltitrexed, ramosetrón, inhibidores de RAS farnesil proteína transferasa, inhibidores de RAS, inhibidores de RAS-GAP, reteliptina desmetilada, etidronato de renio RE 186, rizoxina, riboprina, ribozimas, RII retinamida, ARNi, rogletimida, rohitukina, romurtida, roquinimex, rubiginona B1, ruboxil, safingol, clorhidrato de safingol, saintopina, sarcnu, sarcotitol A, sargramostim, miméticos de SDI1, semustina, inhibidor 1 derivado de la senescencia, oligonucleótidos sentido, inhibidores de la transducción de señales, moduladores de la transducción de señales, simtrazeno, proteína de unión al antígeno monocatenario, sizofiran, sobuzoxano, borocaptato sódico, fenilacetato sódico, solverol, proteína de unión a somatomedina, sonermina, esparfosato sódico, ácido esparfósico, esparsomicina, espicamicina D, clorhidrato de espirogermanio, espiromustina, espiroplatino, esplenopentina, espongistatina 1, escualamina, inhibidor de células madre, inhibidores de la división de células madre, estipiámina, estreptonigrina, estreptozocina, inhibidores de estromelisin, sulfinosina, sulofenur, antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo, suradista, suramina, swainsonina, glicosaminoglicanos sintéticos, talisomicina, talimustina, metyoduro de tamoxifeno, taumustina, tazaroteno, tecogalan sodio, tegafur, telurapirilio, inhibidores de telomerasa, clorhidrato de teloxantrona, temoporfina, temozolomida, tenipósido, teroxirona, testolactona, tetraclorodecaóxido, tetrazomina, taliblastina, talidomida, tiamiprina, tiocoralina, tioguanina, tiotepa, trombopoyetina, mimético de trombopoyetina, timalfasina, agonista del receptor de timopoyetina, timotrinán, hormona estimulante tiroidea, tiazoferina, etiopurpurina de etilo y de estaño, tirapazamina, bicloruro de titanoceno, clorhidrato de topotecán, topsentina, toremifeno, citrato de toremifeno, factor de células madre pluripotentes, inhibidores de la transducción, acetato de trestolona, tretinoína, triacetiluridina, triciribina, fosfato de triciribina, trimetrexato, glucuronato de trimetrexato, triptorelina, tropisetron, clorhidrato de tubulozol, turosterida, inhibidores de tirosina quinasa, tirfostinas, inhibidores de UBC, ubenimex, mostaza de uracilo, uredepa, factor inhibidor de crecimiento derivado del seno urogenital, antagonistas del receptor de urocinasa, vaporeotida, variolina B, velaresol, veramina, verdinas, verteporfina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, vindesina, sulfato de vindesina, sulfato de vinepidina, sulfato de vinglicinato, sulfato de vinleurosina, vinorelbina o tartrato de vinorelbina, sulfato de vinrosidina, vinxaltina, sulfato de vinzolidina, vitaxina, vorozol, zanoterona, zeniplatino, zilascorb, zinostatina, estimalámero de zinostatina, o clorhidrato de zorrubicina.

El agente terapéuticamente activo puede ser un fármaco usado para tratar la enfermedad de Parkinson que incluye L-dopa, selegilina, apomorfina y anticolinérgicos. La L-dopa (levodihidroxi-fenilalanina) (sinemet) es un precursor de la dopamina que puede atravesar la barrera hematoencefálica y convertirse en todopamina en el cerebro. Desafortunadamente, la L-dopa tiene una semivida corta en el cuerpo y es típico que después de un uso prolongado (es decir, después de aproximadamente 4-5 años) el efecto de la L-dopa se vuelva esporádico e impredecible, dando como resultado fluctuaciones en la función motora, discinesias y efectos secundarios psiquiátricos. Adicionalmente, la L-dopa puede provocar la aparición de deficiencias de vitamina B. La selegilina (Deprenyl®, Eldepryl®) se ha utilizado como alternativa a la L-dopa y actúa reduciendo la degradación de la dopamina en el cerebro. Desafortunadamente, la selegilina se vuelve ineficaz después de aproximadamente nueve meses de uso. La apomorfina, un agonista del receptor de dopamina, se ha utilizado para tratar la enfermedad de Parkinson, aunque provoca vómitos intensos cuando se utiliza sola, así como reacciones cutáneas, infección, somnolencia y algunos efectos secundarios psiquiátricos. Los fármacos anticolinérgicos administrados sistémicamente (tales como benzhexol y orfenedrina) también se han utilizado para tratar la enfermedad de Parkinson y actúan reduciendo la cantidad de acetilcolina producida en el cerebro y, por lo tanto, corrigen el desequilibrio entre dopamina/acetilcolina presente en la enfermedad

de Parkinson. Desafortunadamente, aproximadamente el 70 % de los pacientes que toman anticolinérgicos administrados por vía sistémica desarrollan efectos secundarios neuropsiquiátricos graves, incluyendo alucinaciones, así como movimientos discinéticos y otros efectos resultantes de una amplia distribución de anticolinérgicos, incluidos efectos en la visión, dificultad para tragar, sequedad de boca y retención de orina. [34].

Los agentes terapéuticos que son fármacos para el tratamiento de la EA no pueden curar la EA ni detener su progresión, pero pueden ayudar a disminuir los síntomas, tal como la pérdida de memoria y la confusión, durante un tiempo limitado y pueden usarse de acuerdo con la invención. La FDA ha aprobado dos tipos de medicamentos: inhibidores de la colinesterasa (Aricept®, Exelon®, Razadyne®, Cognex®) y memantina (Namenda®), para tratar los síntomas cognitivos (pérdida de memoria, confusión y problemas con el pensamiento y el razonamiento) de la enfermedad de Alzheimer. A medida que avanza la enfermedad de Alzheimer, las células cerebrales mueren y se pierden las conexiones entre las células, lo que empeora los síntomas cognitivos. Si bien los medicamentos actuales no pueden detener el daño que causa el Alzheimer a las células cerebrales, pueden ayudar a disminuir o estabilizar los síntomas durante un tiempo limitado al afectar a ciertos productos químicos involucrados en la transmisión de mensajes entre las células nerviosas del cerebro. A veces, los médicos recetan ambos tipos de medicamentos juntos. Algunos médicos también prescriben altas dosis de vitamina E para los cambios cognitivos de la enfermedad de Alzheimer.

Ningún tratamiento puede alterar el curso de la enfermedad de Huntington. Pero los agentes terapéuticos pueden aliviar algunos síntomas del movimiento y los trastornos psiquiátricos. Y múltiples intervenciones pueden ayudar a una persona a adaptarse a los cambios en sus habilidades durante un cierto periodo de tiempo. Es probable que el manejo de la medicación evolucione a lo largo del curso de la enfermedad, dependiendo de los objetivos generales del tratamiento. Además, los fármacos para tratar algunos síntomas pueden producir efectos secundarios que empeoran otros síntomas. Por lo tanto, los objetivos y el plan del tratamiento se revisarán y actualizarán periódicamente. Los fármacos para tratar los trastornos del movimiento incluyen los siguientes: La tetrabenazina (Xenazine) está específicamente aprobada por la FDA para suprimir los movimientos involuntarios de espasmos y retorcimientos (corea) asociados con la enfermedad de Huntington. Otros posibles efectos secundarios incluyen somnolencia, náuseas e inquietud. Los fármacos antipsicóticos, tales como haloperidol (Haldol®) y clorpromazina, tienen el efecto secundario de suprimir los movimientos. Por lo tanto, pueden resultar beneficiosos para tratar la corea. Sin embargo, estos fármacos pueden empeorar las contracciones involuntarias (disonía) y la rigidez muscular. Los fármacos más nuevos, tal como risperidona (Risperdal®) y quetiapina (Seroquel®), pueden tener menos efectos secundarios, pero deben usarse con precaución, ya que también pueden empeorar los síntomas. Otros medicamentos que pueden ayudar a suprimir la corea incluyen amantadina, levetiracetam (Keppra®) y clonazepam (Klonopin®). En dosis altas, la amantadina puede empeorar los efectos cognitivos de la enfermedad de Huntington. También puede causar hinchazón de las piernas y decoloración de la piel. Los efectos secundarios del levetiracetam incluyen náuseas, malestar estomacal y cambios de humor. El clonazepam puede empeorar los efectos secundarios cognitivos de la enfermedad de Huntington y causar somnolencia. También tiene un alto riesgo de dependencia y abuso.

En determinadas realizaciones, se apreciará que la dosis exacta del agente terapéutico es elegida por el médico individual en vista del paciente a tratar, en general, la dosis y la administración se ajustan para proporcionar una cantidad eficaz del agente terapéutico al paciente que está siendo tratado. La cantidad eficaz de un agente terapéutico se refiere a la cantidad necesaria para provocar la respuesta biológica deseada. Como apreciarán los expertos habituales en la técnica, la cantidad eficaz de un agente terapéutico puede variar dependiendo de factores tales como el criterio de valoración biológico deseado, el fármaco a administrar, el tejido diana, la vía de administración, etc. En determinadas realizaciones, la nanopartícula libera una cantidad eficaz del agente biológicamente activo durante un periodo de al menos 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, una hora, dos horas, cuatro horas, seis horas, diez horas, un día, tres días, siete días, diez días, dos semanas, un mes o más. La cantidad eficaz de un fármaco anticanceroso podría ser la cantidad que da como resultado una reducción del tamaño del tumor en una cantidad deseada durante un periodo de tiempo deseado. Los factores adicionales que pueden tenerse en cuenta incluyen la gravedad del estado de la patología; la edad, el peso y el sexo del paciente tratado; la dieta, el momento y la frecuencia de administración; combinaciones de fármacos; sensibilidades de reacción; y tolerancia/respuesta a la terapia. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de los agentes terapéuticos en el sistema de administración de la presente invención se decidirá por el médico tratante dentro del alcance del buen criterio médico. Dicha información se puede usar a continuación para determinar las dosis útiles y las vías de administración en seres humanos.

Formulaciones farmacéuticas

Las nanopartículas divulgadas en el presente documento pueden combinarse con vehículos farmacéuticamente aceptables para formar una composición farmacéutica, de acuerdo con otro aspecto de la invención. Como apreciaría un experto en esta técnica, los vehículos pueden elegirse basándose en la vía de administración como se describe a continuación, la ubicación del problema objetivo, el fármaco que se administra, el tiempo de administración del fármaco, etc.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar a un paciente por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, inyección estereotáxica. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse para su administración mediante inyección en el área diana del cerebro. Además, dentro

de otras realizaciones, los compuestos o composiciones proporcionados en el presente documento pueden mezclarse con otros vehículos (por ejemplo, polímeros), agentes de formación de imágenes (por ejemplo, mediante imágenes por resonancia magnética, imágenes ópticas, tomografía por emisión de positrones, tomografía computarizada de rayos X e imágenes por ultrasonido) e implantarse en o contenidos dentro de dispositivos que están diseñados para liberar dichos compuestos. En realizaciones adicionales, los compuestos pueden administrarse bajo guía visual radioscópica o de otro tipo a un sitio deseado.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden colocar dentro de recipientes o kits, junto con material de envasado que proporciona instrucciones sobre el uso de dichas composiciones farmacéuticas. Generalmente, dichas instrucciones incluirán una expresión tangible que describe la concentración de reactivo, así como en determinadas realizaciones, cantidades relativas de ingredientes excipientes o diluyentes (por ejemplo, agua, solución salina o PBS) que pueden ser necesarios para reconstituir la composición farmacéutica.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando la nanopartícula en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes conocidos en la técnica, según sea necesario, seguido de esterilización por filtrado. Estas preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas inyectables estériles pueden formularse según la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente atóxico por vía parenteral aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, se usan convencionalmente aceites fijos estériles en forma de un disolvente o un medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite no volátil suave, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, se usan ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables. Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de bacterias o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

En determinadas realizaciones, se apreciará que la dosis exacta de la nanopartícula dirigida a la proteína Fn14 es elegida por el médico individual en vista del paciente a tratar, en general, la dosis y la administración se ajustan para proporcionar una cantidad eficaz de la nanopartícula al paciente que está siendo tratado. Como se usa en el presente documento, la "cantidad eficaz" de una nanopartícula dirigida a la proteína Fn14 se refiere a la cantidad necesaria para provocar la respuesta biológica deseada. Como apreciarán los expertos habituales en la técnica, la cantidad eficaz de partículas dirigidas a la proteína Fn14 puede variar dependiendo de factores tales como el criterio de valoración biológico deseado, el fármaco a administrar, el tejido diana, la vía de administración, etc. Por ejemplo, la cantidad eficaz de partícula dirigida a la proteína Fn14 que contiene un fármaco anticanceroso podría ser la cantidad que da como resultado una reducción en el tamaño del tumor en una cantidad deseada durante un periodo de tiempo deseado. Los factores adicionales que pueden tenerse en cuenta incluyen la gravedad del estado de la patología; la edad, el peso y el sexo del paciente tratado; la dieta, el momento y la frecuencia de administración; combinaciones de fármacos; sensibilidades de reacción; y tolerancia/respuesta a la terapia. Las nanopartículas de la invención se pueden formular en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. En determinadas realizaciones, la nanopartícula dirigida a Fn14 libera una cantidad efectiva del agente biológicamente activo durante un periodo de al menos 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, una hora, dos horas, cuatro horas, seis horas, diez horas, un día, tres días, siete días, diez días, dos semanas, un mes o más. La expresión "forma de unidad de dosificación", como se usa en el presente documento, se refiere a una unidad físicamente discreta de nanopartícula apropiada para el paciente a tratar. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de las composiciones de la presente invención se decidirá por el médico especialista dentro del alcance del buen criterio médico. Para cualquier nanopartícula, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, normalmente ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo animal también se utiliza para lograr un intervalo de concentración y una vía de administración deseables. Dicha información se puede usar a continuación para determinar las dosis útiles y las vías de administración en seres humanos.

La eficacia terapéutica y la toxicidad de las nanopartículas se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, la DE_{50} (la dosis es terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población) y la DL_{50} (la dosis es letal para el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la relación DL_{50}/DE_{50} . Las composiciones farmacéuticas que presentan grandes índices terapéuticos pueden ser útiles en algunas realizaciones. Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosis para uso humano.

En una realización ilustrativa, se divulga una composición farmacéutica que incluye una pluralidad de nanopartículas, cada una de las cuales comprende un agente biológicamente activo; de aproximadamente 0,1 a aproximadamente el 30 por ciento en moles del contenido total de polímero, o de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 20 por ciento en moles, o de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10 por ciento en moles, o de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 5 por ciento en moles del contenido total de polímero de una nanopartícula, es decir, conjugado con un anticuerpo monoclonal Fn14 que tiene un peso molecular entre aproximadamente 100 g/mol y 500 g/mol; y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, el polímero puede tener entre aproximadamente

el 0,001 y el 5 por ciento en peso del anticuerpo Fn14 con respecto al contenido total de polímero. En algunas realizaciones, se contempla una composición adecuada para congelar, incluidas las nanopartículas divulgadas en el presente documento y una solución adecuada para congelar, por ejemplo, se añade una solución de sacarosa a la suspensión de nanopartículas. La sacarosa puede, por ejemplo, como crioprotector, evitar que las partículas se agreguen al congelarse. Por ejemplo, en el presente documento se proporciona una formulación de nanopartículas que comprende una pluralidad de nanopartículas divulgadas, sacarosa y agua; en la que la relación nanopartículas/sacarosa/agua es de aproximadamente el 3-30 %/10-30 %/50-90 % (p/p/p) o aproximadamente el 5-10 %/10-15 %/80-90 % (p/p/p).

Composiciones para su uso en métodos de tratamiento

En algunas realizaciones, los sistemas de administración dirigida a base de particulado específicos de estructura de acuerdo con la presente invención se pueden usar en un método para tratar, aliviar, recuperar, mitigar, retrasar el inicio, inhibir la progresión, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o afección del cerebro. En algunas realizaciones, estos sistemas de administración dirigida basados en particulado específicos de estructura pueden usarse para tratar tumores sólidos, por ejemplo, cáncer y/o células cancerosas. En determinadas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención pueden usarse para tratar cualquier cáncer en el que Fn14 se exprese en la superficie de las células cancerosas o en la neovascularización del tumor en un sujeto que lo necesite, incluida la neovascularización de los tumores de glioblastoma.

En una enseñanza de la invención, los sistemas de administración descritos pueden usarse en un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, específicamente, se proporciona cáncer (por ejemplo, del cerebro, glioblastoma, del pulmón, de la mama). En algunas enseñanzas, el tratamiento del cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de nanopartículas dirigidas a un sujeto que lo necesite, en dichas cantidades y durante el tiempo que sean necesarios para conseguir el resultado deseado. En un aspecto de la invención, se proporciona un método para administrar composiciones de la invención a un sujeto que padece cáncer (por ejemplo, glioblastoma). En algunas enseñanzas, las partículas se administran a un sujeto en las cantidades y durante el tiempo necesarios para lograr el resultado deseado (es decir, el tratamiento del cáncer). Los protocolos terapéuticos de la invención implican administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula dirigida de la invención a un individuo sano (es decir, un sujeto que no muestra ningún síntoma de cáncer y/o que no ha sido diagnosticado con cáncer). Por ejemplo, los individuos sanos pueden ser "inmunizados" con una partícula dirigida de la invención antes del desarrollo de cáncer y/o la aparición de síntomas de cáncer; individuos en riesgo (por ejemplo, los pacientes que tienen antecedentes familiares de cáncer; los pacientes portadores de una o más mutaciones genéticas asociadas al desarrollo de cáncer; los pacientes con un polimorfismo genético asociado al desarrollo de cáncer; los pacientes infectados por un virus asociado al desarrollo de cáncer; los pacientes con hábitos y/o estilos de vida asociados al desarrollo de cáncer; etc.) pueden tratarse de manera sustancialmente contemporánea (por ejemplo, a las 48 horas, a las 24 horas o a las 12 horas) a la aparición de síntomas de cáncer. Por supuesto, las personas que se sabe que tienen cáncer pueden recibir un tratamiento de la invención en cualquier momento.

En otras enseñanzas, las nanopartículas de la presente invención se pueden usar para inhibir el crecimiento de células cancerosas, por ejemplo, células de glioblastoma. Preferentemente, tal inhibición a nivel celular puede reducir el tamaño, detener el crecimiento, reducir la agresividad, o prevenir o inhibir la metástasis de un cáncer en un paciente. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente, mediante cualquiera de diversos indicadores adecuados, si se inhibe el crecimiento de células cancerosas. La inhibición del crecimiento de las células cancerosas se puede evidenciar, por ejemplo, mediante la detención de las células cancerosas en una fase particular del ciclo celular, por ejemplo, la detención en la fase G2/M del ciclo celular. La inhibición del crecimiento de las células cancerosas también se puede evidenciar mediante la medición directa o indirecta del tamaño de las células cancerosas o del tumor. En pacientes humanos con cáncer, dichas mediciones se realizan generalmente usando métodos de formación de imágenes bien conocidos tales como imágenes por resonancia magnética, tomografía axial computarizada y rayos X. El crecimiento de células cancerosas también se puede determinar indirectamente, tal como, determinando los niveles de antígeno carcinoembrionario en circulación, antígeno específico de próstata u otros antígenos específicos de cáncer que se correlacionan con el crecimiento de células cancerosas. La inhibición del crecimiento del cáncer también se correlaciona generalmente con una supervivencia prolongada y/o una mayor salud y bienestar del sujeto.

También se enseñan en el presente documento métodos para administrar a un paciente una nanopartícula divulgada en el presente documento que incluye un agente activo, en los que, tras la administración a un paciente, dichas nanopartículas reducen sustancialmente el volumen de distribución y/o reducen sustancialmente la C_{max} libre, en comparación con la administración del agente en solitario (es decir, no como una nanopartícula divulgada).

Terapia génica

Las mutaciones genéticas complejas son comunes en el cáncer de cerebro, lo que hace que la terapia génica sea un enfoque atractivo para reparar o modular genes y rutas celulares alterados. La terapia génica es la administración de un gen que codifica una proteína de interés como agente farmacéutico para tratar enfermedades. Deriva su nombre de la idea de que un gen puede administrarse para complementar o alterar otros genes dentro de las células de un individuo como terapia para tratar una enfermedad. Primero, los científicos dieron el paso lógico de intentar introducir

genes directamente en las células humanas, centrándose en las enfermedades causadas por defectos de un solo gen, tal como fibrosis quística, hemofilia, distrofia muscular y anemia de células falciformes. Sin embargo, esto ha demostrado ser más difícil que modificar bacterias, principalmente debido a los problemas que implica transportar grandes secciones de ADN y entregarlas al sitio correcto en el genoma diana comparativamente grande. Hoy en día, la mayoría de los estudios de terapia génica están dirigidos al cáncer y las enfermedades hereditarias vinculadas a un defecto genético. Existe diversos métodos diferentes para reemplazar o reparar los genes dirigidos en la terapia génica. Un gen normal puede insertarse en una ubicación no específica dentro del genoma para reemplazar un gen no funcional. O bien, un gen anormal podría intercambiarse por un gen normal mediante recombinación homóloga. Por otro lado, el gen anormal podría repararse mediante una mutación inversa selectiva, que devuelve el gen a su función normal. La regulación (el grado en el que un gen se activa o desactiva) de un gen en particular podría alterarse.

La forma más común de terapia génica implica el uso de ADN que codifica un gen terapéutico funcional para reemplazar un gen mutado. Otras formas implican la corrección directa de una mutación o el uso de ADN que codifica una proteína terapéutica (en lugar de un gen humano natural) para proporcionar tratamiento. En la terapia génica, el gen está envuelto dentro de un "vector", que se usa para transferir el gen a las células diana dentro del cuerpo. Una vez dentro, el ADN se expresa por la maquinaria celular, dando como resultado la producción de proteína terapéutica, que a su vez trata la enfermedad del paciente. La terapia génica utiliza la administración de ADN a las células, lo que se puede lograr mediante varios métodos, resumidos a continuación.

La mayoría de los ensayos clínicos actuales basados en terapia génica han utilizado virus para administrar ADN terapéutico. Si bien algunos virus pueden proporcionar una transferencia génica segura en seres humanos, los ensayos clínicos de fase III no han demostrado eficacia terapéutica debido en parte a las importantes respuestas inmunitarias del huésped, la distribución terapéutica limitada, y la rápida depuración. Los vectores génicos no virales pueden ofrecer la administración de ADN sin el riesgo de inmunogenicidad y/o mutagénesis de inserción que son comunes con los vectores virales y han surgido como una alternativa a las estrategias virales. Los beneficios de los vectores no virales incluyen inmunogenicidad reducida, facilidad de fabricación, falta de riesgo de replicación e inserción del vector y capacidad para alojar ADN plasmídico más grande en comparación con los virus comúnmente probados, tales como los virus adenoasociados. El desarrollo clínico de vectores no virales se ha visto obstaculizado en parte por eficiencias de transferencia génica relativamente bajas en comparación con los vectores virales. Esto puede deberse a la incapacidad de superar diversas barreras biológicas. Una barrera particularmente desafiante implica el tráfico endolisosómico dentro de las células, donde el ADN terapéutico a menudo se degrada en los endosomas y lisosomas tardíos ácidos y ricos en enzimas antes de llegar al núcleo. Una estrategia común para superar esta barrera es incorporar grupos funcionales con capacidad tamponante de ácido-base entre pH 5,1-7,4, que presumiblemente media el escape de la degradación endolisosómica de pH más bajo.

En determinadas enseñanzas, los sistemas de administración dirigidos a base de particulado específicos de estructura pueden comprender nanopartículas de ADN altamente compactadas, compuestas de lisina 30-mer que se conjugan con polietilenglicol a través de un solo resto de cisteína (CK₃₀PEG) y representan una tecnología no viral prometedora que ha demostrado una eficacia notable en la entrega de genes al cerebro, los ojos y los pulmones, con una toxicidad e inmunogenicidad mínimas. Se desarrolló una nanopartícula de ADN sensible al pH, CH₁₂K₁₈PEG_{5K} insertando un segmento de poli-L-histidina entre PEG y poli-L-lisina para diseñar un copolímero tribloque. [35]. La eficiencia de la transferencia génica *in vitro* de nanopartículas de ADN CH₁₂K₁₈PEG_{5K} se evaluó en células GL261 usando el plásmido indicador, pRNAT-H1.3/Hygro/siFlu. Las nanopartículas de ADN CH₁₂K₁₈PEG_{5K} altamente compactadas probadas en estudios de administración génica de tumores cerebrales también mostraron una transferencia génica eficiente a células tumorales cerebrales *in vivo* y silenciaron eficazmente un transgén específico de tumor (luciferasa de luciérnaga) después de la inyección directa en GBM intracraneal de ratón. Simplemente, las nanopartículas de ADN CH₁₂K₁₈PEG_{5K} pudieron desactivar la luciferasa en un modelo de glioma de ratón intracraneal GL261. Estos resultados demuestran la utilidad de utilizar esta tecnología basada en nanopartículas de ADN para administrar genes a células tumorales como un posible enfoque terapéutico para pacientes con cáncer de cerebro.

Se contempla además que, en otras realizaciones, cualquier unión no específica potencial de estas nanopartículas de ADN al cerebro se puede minimizar al permitir el direccionamiento activo de células de glioblastoma positivas para Fn14 incorporando el resto de direccionamiento en la nanopartícula de ADN altamente compactada que tiene la construcción génica de interés. Lograr una distribución eficaz de las terapias en la extensión completa de los gliomas invasivos y administrar estas terapias lo más directamente posible a las células tumorales, al tiempo que tiene efectos expectantes mínimos en las neuronas adyacentes y la glía, es un objetivo principal de los sistemas de administración avanzados para esta enfermedad. Por lo tanto, el direccionamiento del producto terapéutico a las células tumorales y/o al microambiente cercano representa una próxima etapa crítica. Los estudios anteriores que exploran este enfoque para GBM han incluido: direccionamiento de las moléculas de la superficie celular tumoral tal como el receptor del factor de crecimiento epidérmico [35] y el receptor de interleucina 13 [36], y direccionamiento a componentes de la matriz extracelular asociados a tumor tal como Tenascin C21. Estos restos de direccionamiento se han visto limitados por tres problemas principales: (1) interacciones adhesivas con estructuras no diana, (2) diana presente solo en un porcentaje relativamente pequeño de células o regiones tumorales, y (3) diana no específica para células *invasoras*. Para abordar estos problemas, la nanopartícula de ADN puede desarrollarse adicionalmente para acoplarse con anticuerpos Fn14 o fragmentos de los mismos para adherirse específicamente a la estructura o estructuras de interés.

Para administrar la nanopartícula de ADN específicamente a una región particular del cerebro y/o a una población particular de células del SNC, el vector puede administrarse mediante microinyección estereotáxica. Por ejemplo, los pacientes tienen la base del marco estereotáxico fija en su lugar (atornillada en el cráneo). Se obtienen imágenes del cerebro con una base de marco estereotáxica (resonancia magnética compatible con marcas fiduciales) mediante resonancia magnética de alta resolución. A continuación, las imágenes de resonancia magnética se transfieren a un ordenador que ejecuta un software estereotáxico. Se utiliza una serie de imágenes coronales, sagitales y axiales para determinar el objetivo (lugar de inyección de nanopartículas) y la trayectoria. El software traslada directamente la trayectoria a coordenadas tridimensionales apropiadas para el marco estereotáxico. Se perforan orificios de trépano por encima del sitio de entrada y se coloca el aparato estereotáxico con la aguja implantada a la profundidad dada. A continuación, la nanopartícula se inyecta en los sitios objetivo. Dado que la nanopartícula se integra en las células diana, en lugar de producir partículas virales, la posterior propagación del vector es menor, y principalmente una función de la difusión pasiva desde el sitio de inyección y, por supuesto, el transporte trans-sináptico deseado, antes de la integración. El grado de difusión puede controlarse ajustando la relación de vector a un vehículo fluido.

Las células diana de las nanopartículas de la presente invención pueden incluir células de glioblastoma en pacientes con cáncer de cerebro y células del sistema nervioso central de un sujeto que padece una enfermedad neurodegenerativa tal como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, o enfermedad de Huntington, preferiblemente células neurales. Preferentemente, el sujeto es un ser humano, generalmente un adulto.

Sin embargo, la invención incluye la administración de la nanopartícula de ADN a modelos biológicos de la enfermedad. En ese caso, el modelo biológico puede ser cualquier mamífero en cualquier fase de desarrollo en el momento de la administración, por ejemplo, embrionario, fetal, infantil, juvenil o adulto, preferentemente es un adulto. Además, las células diana del SNC pueden ser esencialmente de cualquier fuente, especialmente primates y mamíferos no humanos de los órdenes Rodenta (ratones, ratas, conejos, hámsteres), Carnívora (gatos, perros), y Arteriodactyla (vacas, cerdos, ovejas, cabras, caballos), así como cualquier otro sistema no humano (por ejemplo, sistema modelo de pez cebra).

Las nanopartículas poliméricas biodegradables facilitan la transferencia génica no viral a células madre embrionarias humanas (hESC). Las partículas pequeñas (aproximadamente 200 nm), cargadas positivamente (aproximadamente 10 mV) se forman mediante el autoensamblaje de poli(beta-amino ésteres) catiónicos, hidrolíticamente degradables y ADN plasmídico.

5. Ejemplos

La invención se ilustra en el presente documento mediante los experimentos descritos por los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes. Los expertos en la técnica entenderán que esta invención puede realizarse de muchas formas diferentes y no debe interpretarse como limitada a las realizaciones expuestas en el presente documento. Más bien, estas realizaciones se proporcionan para que esta descripción transmita completamente la invención a los expertos en la técnica. A un experto en la técnica a la que pertenece esta invención se le ocurrirán muchas modificaciones y otras realizaciones de la invención que tengan el beneficio de las enseñanzas presentadas en la descripción anterior. Aunque se emplean términos específicos, se utilizan como en la técnica a menos que se indique de otro modo.

Ejemplo 1: Materiales y métodos

PEG de 5 kDa de PM, metoxi-PEG5k-amina y maleimida-PEG5k-amina reactiva con tiol, se adquirieron de Creative PEGWorks (Winston Salem, NC). Las placas de cultivo tisular con fondo de vidrio Lab-Tek y las columnas Zeba Spin (corte de 7 kDa de PM) se adquirieron de ThermoFisher Scientific (Rochester, NY). El anticuerpo monoclonal ITEM4 se adquirió en eBioscience (San Diego, CA). Las FluoSpheres modificadas con carboxilato rojo (0,1 µm, 540/590 de excitación/emisión) y azul (0,1 µm, 350/440 de excitación/emisión) y Hoechst 34580 se adquirieron en Invitrogen (Carlsbad, CA). Se adquirieron microesferas de carboxilo no fluorescentes (0,1 µm) en Bang's Laboratories (Fishers, IN). La D-luciferina se obtuvo en Promega (Madison, WI). El kit de ensayo de cuantificación de tiol (fluorométrico) era de Abcam (Cambridge, MA). El clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS), tampón fosfato, clorhidrato de 2-iminotilano y todos los demás productos químicos se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Preparación de ITEM4-SH

ITEM4 se modificó con tiol mediante la reacción de aminas libres con 2-iminotilano. Brevemente, ITEM4 (0,5 mg/ml) se mezcló con 2-iminotilano (exceso molar 400x con respecto a ITEM4) en tampón fosfato 100 mM con EDTA (pH 7,2, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM) en un tubo siliconizado. Se dejó que la reacción prosiguiera durante 2 h a temperatura ambiente para producir ITEM4 tiolado (ITEM4-SH). Después de la reacción, la solución resultante se purificó con columnas Zeba Spin (corte de 7 kDa de PM) y se congeló inmediatamente para evitar la posible formación de enlaces disulfuro (S-S) entre los grupos tiol recién generados. El grado de tiolación de ITEM 4-SH se determinó usando el kit de ensayo de cuantificación de tiol (ensayo fluorométrico, Abcam, Cambridge, MA) según las recomendaciones del fabricante. Se usó estándar de glutatión (GSH) para generar una curva estándar para determinar el número de grupos

tiol por ITEM4.

Preparación de nanopartículas

- 5 Los métodos detallados a continuación son los principales métodos de formulación usados para la generación de nanopartículas penetrantes de tejido (TPN). Sin embargo, existe una amplia diversidad de métodos de formulación, polímeros, ligandos y químicas que se pueden usar para lograr nanopartículas dirigidas penetrantes de tejido, como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2013/0183244A.

10 a. Nanopartículas no biodegradables

Se sintetizaron nanopartículas a partir de poliestireno modificado con COOH (PS) NP (PS-COOH). En primer lugar, se añadieron nanopartículas PS-COOH a un tubo de microcentrífuga siliconizado (Sigma) y se completaron hasta un volumen de 500 µl con tampón fosfato (NaCl 50 mM, Na(PO₃)₄ 100 mM, pH 7,2). Se disolvió directamente PEG (una
15 mezcla de NHRPEGsk-OCH₃ y NHR PEGsk-maleimida o de NHRPEG5k-OCH₃ y NHRPEG5k-N3) (equivalente a 10 veces los grupos COOH en la superficie de las esferas de PS-COOH), seguido de un exceso de sulfo-NHS (-5-6 mg) y exceso de EDC (-3-4 mg). Se dejó que la reacción prosiguiera durante 4 horas a 25 °C. Las nanopartículas se purificaron mediante ultracentrifugación a través de un dispositivo de ultrafiltración AmiconUltra de 15 ml de 100 kDa (Millipore) y se lavaron con 15 ml de agua ultrapura (3 lavados en total).

20 Se realizó la química de maleimida-tiol o N3-alquino para conjugar un ligando modificado con tiol o modificado con alquino con la superficie de la nanopartícula. Brevemente, las nanopartículas purificadas se mezclaron con ligando modificado en tampón fosfato y se dejaron reaccionar durante una noche con agitación a 4 °C. Las nanopartículas se purificaron a partir del ligando sin reaccionar mediante diálisis durante 5 días usando casetes de diálisis Float-a-Lyzer (MWCO de 1000 kDa, Spectrum Labs).
25

b. Polímeros biodegradables

30 Los métodos descritos a continuación son los que utilizan un polímero (poli(ácido láctico-co-glicólico) o PLGA). Este método se puede utilizar para generar partículas penetrantes del cerebro modificadas con ligando con diversos polímeros hidrófobos diferentes (por ejemplo, otros poliésteres tales como poli(ácido láctico), policaprolactona, así como polianhídridos y muchos otros). Además, en determinadas realizaciones, se pueden usar varias otras técnicas estándar de formulación de partículas hidrófobas (por ejemplo, emulsión simple, emulsión doble, extracción por saturación de sal, etc.). El ligando usado podría ser una molécula pequeña, anticuerpo, fragmento de anticuerpo,
35 proteína, ácido nucleico, etc. La química de acoplamiento entre la partícula/polímero y el ligando también se puede modificar según sea necesario basándose en el ligando.

Conjugación directa con el polímero antes de la formulación de partículas (para ligandos solubles y estables en disolventes orgánicos)

40 Se disolvieron PLGA, PLGA-PEG y PLGA-PEG-ligando a 25 mg/ml en tetrahidrofurano (THF), junto con una cantidad de fármaco/producto terapéutico. Se formaron nanopartículas mediante nanoprecipitación tras la adición de las soluciones de THF a agua ultrapura agitada (o tampón apropiado para asegurar la estabilidad del ligando). Se dejó evaporar el disolvente (THF) con agitación durante dos horas y posteriormente se concentraron y se lavaron las
45 nanopartículas tres veces con agua UP a través de ultrafiltración con unidades de filtro centrífugo de 100 kDa (Millipore).

Conjugación de ligando con partículas después de la formulación de partículas (para ligandos que no son solubles o estables en disolventes orgánicos)

50 Se disolvieron PLGA, PLGA-PEG, y PLGA-PEG-maleimida (o PLGA-PEG-azida) en 25 mg/ml en tetrahidrofurano (THF), junto con una cantidad de fármaco/producto terapéutico. Se formaron nanopartículas mediante nanoprecipitación tras la adición de las soluciones de THF a agua ultrapura agitada (o tampón apropiado para asegurar la estabilidad del ligando). Se dejó evaporar el disolvente (THF) con agitación durante dos horas y posteriormente se concentraron y se lavaron las nanopartículas tres veces con agua UP a través de ultrafiltración con unidades de filtro
55 centrífugo de 100 kDa (Millipore).

Se realizó la química de maleimida-tiol o N3-alquino para conjugar un ligando modificado con tiol o modificado con alquino con la superficie de la NP. Brevemente, se mezclan NP purificadas con ligando modificado en tampón fosfato y se dejan reaccionar durante una noche con agitación a 4 °C. Las nanopartículas se purificaron a partir del ligando sin reaccionar mediante diálisis durante 5 días usando casetes de diálisis Float-a-Lyzer (MWCO de 1000 kDa, Spectrum Labs).
60

Formulación detallada de TPN biodegradables dirigidas: polímeros hidrófilos a través de quelación

65 El método detallado a continuación usa un polímero específico (PGA) y un agente/fármaco quelante específico

(cisplatino o CDDP). Este método puede usarse para generar partículas penetrantes del cerebro modificadas con ligando con diversos polímeros hidrófilos diferentes con una alta densidad de cadenas laterales de ácido carboxílico (por ejemplo, ácido hialurónico y ácido poliaspártico).

- 5 Se crearon soluciones madre poliméricas disolviendo polímeros en agua sin nucleasas (PGA, PGA-PEG y PGA-PEG-azida). Las nanopartículas se prepararon mezclando un volumen igual de soluciones madre poliméricas con cisplatino (CDDP) u otro fármaco/molécula quelante, solución madre (1,5 mg/ml de CDDP en agua sin nucleasas). Después de la mezcla, las partículas se dejaron autoensamblar durante más de 3 días con agitación continua a 45 °C. Después de la formación de las partículas, las partículas se lavaron tres veces en agua ultrapura y se concentraron por
10 ultrafiltración con filtros centrífugos de 100 kDa (Amicon® Ultra, Millipore).

- Se realizó la química del N3-alquino para conjugar un ligando modificado con alquino con la superficie de la nanopartícula. Las nanopartículas purificadas se mezclaron con ligando modificado en tampón fosfato diluido y se dejaron reaccionar durante una noche con agitación a 4 °C. Las nanopartículas se purificaron a partir del ligando sin
15 reaccionar mediante diálisis durante 5 días usando casetes de diálisis Float-a-Lyzer (MWCO de 1000 kDa, Spectrum Labs).

Formulación detallada de TPN dirigidas a base de lípidos y copolímeros de bloque anfílicos

- 20 El método detallado a continuación usa un fosfolípido específico (DSPE) y un copolímero dibloque específico (PBD-PEO). Este método puede usarse para generar partículas penetrantes del cerebro modificadas con ligando con diversos diferentes lípidos o copolímeros de bloque anfílicos. Además, se pueden usar varias otras técnicas estándar de encapsulación de fármacos (por ejemplo, gradiente de pH, hidratación, etc.) para encapsular diferentes fármacos/productos terapéuticos. El ligando usado podría ser una molécula pequeña, anticuerpo, fragmento de
25 anticuerpo, proteína, ácido nucleico, etc. La química de acoplamiento entre la partícula/polímero y el ligando también se puede modificar según sea necesario basándose en el ligando.

a. Formulación a base de liposomas

- 30 Se mezcló lípido de 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE) con DSPE-poli(etilenglicol) (DSPE-PEG-maleimida o DSPE-PEG-azida; 5-10 % en peso) en cloruro de metileno. Los liposomas se formaron por hidratación/sonicación en IX PBS junto con una cantidad de fármaco/producto terapéutico a 65 °C durante 1 h. Se logró una distribución de tamaño estrecha de los polimerosomas nanométricos con extrusión en serie utilizando una extrusora manual Liposofast Basic equipada con membranas de policarbonato de 400, 200, 100 y 50 nm (Avestin Inc.,
35 Ottawa, Ontario).

- Se realizó la química de maleimida-tiol o N3-alquino para conjugar un ligando modificado con tiol o modificado con alquino con la superficie de los liposomas. Los liposomas purificados se mezclaron con ligando modificado en tampón fosfato y se dejaron reaccionar durante una noche con agitación a 4 °C. Los liposomas se purificaron a partir del
40 ligando sin reaccionar mediante diálisis durante 5 días usando casetes de diálisis Float-a-Lyzer (MWCO de 1000 kDa, Spectrum Labs).

b. Formulación a base de polimerosomas

- 45 El extremo hidroxilo terminal PEO del copolímero (PEO-b-PBD (PEO = óxido de polietileno; PBD = polibutadieno); Polymer Source, Inc., Montreal, Quebec) se modificó primero con ácido 4-fluoro-3-nitrobenzoico, carbonato de succinimido o ácido carboxílico mediante un procedimiento de esterificación. A continuación, el polímero activado se precipitó usando éter dietílico y se purificó usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los ligandos de direccionamiento se unieron al polímero modificado a través de una sustitución aromática nucleófila y/o a través de
50 una reacción EDC/NHS. La Tat no conjugada se eliminó después de la formación del polimerosoma mediante diálisis extensa en solución salina tamponada con fosfato isotónica (PBS), pH 7,4.

- El polímero seleccionado y el fármaco/producto terapéutico (hidrófobo) se disolvieron en cloruro de metileno y a continuación se depositaron sobre un cuadrado de Teflon rugoso y se secaron durante una noche al vacío. A
55 continuación, se añadió IX PBS junto con una cantidad de fármaco/producto terapéutico (hidrófilo) a un vial de vidrio que contenía la película; a continuación el vial se selló y se dejó en sonicación a 65 °C durante 1 h. Se logró una distribución de tamaño estrecha de los polimerosomas nanométricos con extrusión en serie utilizando una extrusora manual Liposofast Basic equipada con membranas de policarbonato de 400, 200, 100 y 50 nm (Avestin Inc., Ottawa,
60 Ontario).

- Para formular "nanopartículas recubiertas" (CNP) penetrantes del tejido cerebral, se modificaron covalentemente nanopartículas de poliestireno modificado con carboxilato (PS-COOH) de 100 nm con metoxi-PEG5k-amina mediante química de carbodiimida de EDC, siguiendo un protocolo modificado descrito previamente [34, 33]. Para el ensayo de
65 cuantificación de proteínas, se prepararon CNP con nanopartículas PS-COOH no fluorescentes de 100 nm. Para todos los demás experimentos, se utilizaron "nanopartículas no recubiertas" (UNP) de PS-COOH rojo o azul fluorescente de 100 nm. Brevemente, se mezclaron nanopartículas PS-COOH (1 mg) con metoxi-PEG5k-amina (equivalente a 10

veces los grupos COOH totales en la superficie de las partículas PS-COOH) en tampón fosfato 100 mM (pH 7,2, NaCl 150 mM), seguido de la adición de sulfo-NHS en exceso (~5-6 mg) y EDC (~3-4 mg) hasta un volumen de 500 µl. Se colocaron suspensiones de partículas en una incubadora rotatoria y se dejó que la reacción prosiguiera durante 4 h a 25 °C. Después de la reacción, las partículas se purificaron mediante ultracentrifugación (Amicon Ultra-15 ml de corte de 100 kDa de PM) con agua ultrapura (3 lavados en total). Las CNP se resuspendieron en agua ultrapura y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Para las nanopartículas CNP-ITEM4, se usó una proporción diferente de PEG (metoxi-PEG5k-amina con respecto a maleimida-PEG5k-amina) para la PEGilación inicial de partículas; específicamente, se usó el 10 % en moles y el 50 % en moles de maleimida-PEG5k-amina para nanopartículas CNP-ITEM4 (baja) y CNP-ITEM4 (alta), respectivamente. ITEM4-SH se conjugó sobre la superficie de las nanopartículas que contenían PEG funcionalizado con maleimida mediante la química de maleimida-tiol. Brevemente, las partículas de CNP-maleimida purificadas se mezclaron con ITEM4-SH (1,2 veces exceso de ITEM4-SH con respecto a maleimida) en tampón fosfato 100 mM (pH 7,2, NaCl 150 mM) y se dejaron reaccionar durante una noche a 4 °C. Esta reacción se realizó inmediatamente después de la PEGilación de nanopartículas, ya que los tiempos de incubación más largos dieron como resultado un aumento de la hidrólisis de los grupos maleimida. Después de la reacción, las nanopartículas se purificaron a partir de ITEM4-SH libre sin conjugar a través de diálisis (casetes de diálisis Float-a-Lyzer de 1000 kDa) frente a 1X PBS durante 5 días. La cantidad de moléculas ITEM4 conjugadas en nanopartículas CNP-ITEM4 se cuantificó mediante el ensayo de proteína LavaPep (Gel Company, San Francisco, CA) utilizando ITEM4 como estándar. Las muestras de nanopartículas se diluyeron a una concentración de ~100 µg/ml y se ensayaron según el protocolo del fabricante.

Caracterización fisicoquímica de nanopartículas

Las características fisicoquímicas de las nanopartículas se midieron en PBS diluido 15x (NaCl ~10 mM, pH 7,4) a 25 °C. El diámetro hidrodinámico y el potencial ζ (carga superficial) se determinaron mediante dispersión de luz dinámica y anemometría láser Doppler, respectivamente, utilizando un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Southborough, MA). La medición del tamaño de partícula se realizó a 25 °C con un ángulo de dispersión de 173 ° y se informa como la media numérica promedio. Los valores del potencial zeta se calcularon utilizando la ecuación de Smoluchowski y se informa como el potencial zeta medio.

Unión de nanopartículas al dominio extracelular de Fn14

Las afinidades de unión de nanopartículas con respecto al dominio extracelular de Fn14 se evaluaron mediante SPR usando un instrumento Biacore 3000 a 25 °C. El dominio extracelular de Fn14 (Cell Sciences, Canton, MA) se conjugó con un chip CM5 Biacore, con tres valores UR del ligando Fn14 diferentes que variaban de 50 a 300. La primera ruta de flujo (Fc1) se activó y se bloqueó con etanolamina para que sirviera como una referencia para cada ciclo de unión, según lo sugerido por el protocolo del fabricante. El tampón de ejecución se desgasificó con tampón HEPES 10 mM (pH 7,4) que contenía NaCl 150 mM, tensioactivo P-20 al 0,05 % con EDTA 50 µM (HBS-P+). Para los experimentos de SPR, las muestras se analizaron a un caudal de 20 µl/min con un tiempo de inyección de 3 min seguido de un tiempo de espera de 2,5 min para la disociación, antes de la regeneración del chip con ácido fosfórico 100 mM, pH 3 o glicina 10 mM, pH 1,75 (GE Healthcare). Se utilizó el isotipo de IgG (25 nM) como control negativo e ITEM4 (25 nM) como control positivo. Se ensayó la unión de nanopartículas con concentraciones de partículas que variaban entre 1 µg/ml y 200 µg/ml diluidas en tampón de ejecución. Los datos se analizaron usando el software de evaluación Biacore 3000, donde los datos de Fc1 se restaron de los datos de Fc2, Fc3 y Fc4 para obtener los sensoogramas finales. Las afinidades de unión de equilibrio (K_D) se calcularon como se ha descrito previamente [37].

Unión de nanopartículas a proteínas de la matriz extracelular del cerebro

Se aislaron proteínas de la matriz extracelular (ECM) cerebral de ratón recién recogidas como se ha descrito previamente [38]. Brevemente, el cerebro de ratón completo resacado se congeló durante al menos 24 h a -80 °C y posteriormente se descongeló y descelularizó en una serie de etapas: agua ultrapura (16 h a 4 °C), tripsina al 0,02 %/EDTA al 0,05 % (1 h a 37 °C), Triton-X 100 al 3 % (1 h), sacarosa 1,0 M (15 min), agua ultrapura (15 min), desoxicolato al 4 % (1 h), ácido periacético al 0,1 % en etanol al 4 % (2 h), 1X PBS (15 min), agua ultrapura (15 min) y 1X PBS (15 min). Las proteínas descelularizadas se filtraron (filtro de 0,2 µm) para eliminar las proteínas insolubles y a continuación se congelaron y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Las proteínas de la ECM cerebral de ratón aisladas se conjugaron con el segundo canal de flujo (Fc2) de un chip CM5 Biacore con valores UR de ligando comprendidos entre 140 y 250. La primera ruta de flujo se activó y se bloqueó con etanolamina para que sirviera como una referencia para cada ciclo de unión. Para los experimentos de unión, las muestras se ensayaron a un caudal de 20 µl/min con un tiempo de inyección de 3 min seguido de un tiempo de espera de 2,5 min para la disociación, antes de la regeneración del chip con ácido fosfórico 100 mM, pH 3 o glicina 10 mM, pH 1,75 (GE Healthcare). Se ensayó la unión de nanopartículas con concentraciones de partículas que variaban entre 1 µg/ml y 200 µg/ml diluidas en tampón de ejecución.

Cultivo de células

Las células de glioblastoma humano U87 que expresan constitutivamente luciferasa de luciérnaga (U87-Luc) se proporcionaron por el Dr. Andrew Kung (Columbia University Medical Center). Para generar una línea celular U87-Luc positiva para GFP, se mezclaron partículas lentivirales pGIPZ que codificaban TurboGFP (proporcionadas por el Dr. Nhan Tran, TGen) con 8 µg/ml de polibreno y se añadieron a cultivos subconfluentes de células U87-Luc. Las células transducidas positivamente se enriquecieron clasificando en masa las células positivas para GFP usando un citómetro de flujo MoFlo (Dako, Carpinteria, CA). Se cultivaron células U87-Luc/GFP a 37 °C y CO₂ al 5 % en DMEM (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) complementado con suero fetal bovino al 10 % (FBS, Invitrogen Corp.), 0,5 mg/ml de G418, y penicilina/estreptomicina al 1 % (Invitrogen Corp.). Una línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) generada a partir de ratones sin Fn14 (MEF 3.5-/-) y una línea celular MEF 3.5-/- transfectada de forma estable que expresa Fn14 humano (MEF Fn14-V5) [39] se proporcionaron por el Dr. Matthew Hayden (Columbia University Medical Center). Ambas líneas celulares se mantuvieron a 37 °C y CO₂ al 5 % en DMEM complementado con FBS al 10 % y penicilina/estreptomicina al 1 %; el medio celular Fn14-V5 también contenía 10 µg/ml de blasticidina.

Evaluación de la expresión de Fn14 en células

Para examinar la expresión de la superficie de Fn14 en la línea celular U87-Luc/GFP, se realizó un análisis de citometría de flujo. Brevemente, las células (~10⁶) se incubaron sin anticuerpo, isotipo de IgG o ITEM4 durante 30 min en hielo. A continuación, las células se lavaron 3 veces con tampón FACS y se añadió un anticuerpo secundario fluorescente (anti-IgG de ratón-APC) y se dejó incubar durante 15 min. Después de lavar 3 veces en tampón FACS, las células se ensayaron para determinar la intensidad de fluorescencia media de APC usando un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ). Los datos de 10.000 eventos se clasificaron utilizando parámetros de dispersión lateral y frontal para excluir las células muertas y los desechos.

La expresión de Fn14 en las dos líneas celulares MEF, MEF 3.5 -/- y MEF Fn14-V5, se determinó usando análisis tanto de transferencia de Western como de citometría de flujo. Para la transferencia de Western, las células se recogieron raspando y se lisaron en HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, glicerol al 10 % y Triton X-100 al 1 % complementado con un cóctel inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y dos cócteles de inhibidores de fosfatasa (Calbiochem, Billerica, MA). La concentración de proteína de cada lisado se determinó mediante un ensayo de proteínas BCA (Pierce Protein Biology, Rockford, IL). Se sometieron cantidades iguales de proteína a SDS-PAGE (Life Technologies, Grand Island, NY) y se electrotransfirieron a membranas de PVDF (Millipore, Billerica, MA). Las membranas se bloquearon en leche en polvo desnatada al 5 % (NFD) en tampón TBST y a continuación se incubaron secuencialmente con un anticuerpo anti-Fn14 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) o un anticuerpo anti-tubulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y a continuación un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Las membranas se lavaron en TBST y a continuación se detectaron las proteínas inmunorreactivas usando el kit Amersham Enhanced Chemiluminescence Plus (GE Healthcare, Piscataway, NJ) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la citometría de flujo, se incubaron MEF (~10⁶) con Fc Bloc de ratón (BD Biosciences, San Jose, CA) durante 15 min y a continuación se incubaron con: sin anticuerpo, isotipo de IgG-APC o ITEM4-APC durante 30 min en hielo. A continuación, las células se lavaron 3 veces con tampón FACS y después se ensayaron para determinar la intensidad de fluorescencia media de APC mediante citometría de flujo como se ha descrito anteriormente.

Captación de nanopartículas en células positivas para Fn14 y negativas para Fn14

La captación de nanopartículas en las líneas celulares MEF 3.5-/-, MEF Fn14-V5, y U87-Luc/GFP se determinó a través de citometría de flujo. Brevemente, las células se colocaron en placas de 24 pocillos a una densidad de siembra de 10⁵ células por pocillo. Se permitió que las células se unieran durante una noche y al día siguiente se reemplazó el medio con DMEM sin suero junto con nanopartículas (2 µg por pocillo). Las células se incubaron con nanopartículas durante 1 h, se lavaron 3 veces con 1X PBS, se separaron con tripsina y se diluyeron en 1X PBS frío para el análisis de citometría de flujo. La intensidad de la fluorescencia media se analizó utilizando un citómetro de flujo BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ). Los datos de 10.000 eventos se clasificaron utilizando parámetros de dispersión lateral y frontal para excluir las células muertas y los desechos.

Internalización de nanopartículas en células de GBM positivas para Fn14

La internalización de CNP-ITEM4 en células U87-Luc/GFP se confirmó mediante microscopía confocal de células vivas a 37 °C y CO₂ al 5 %. Brevemente, las células se sembraron entre 2,0 y 2,5 x 10³ células por placa en placas de cultivo con fondo de vidrio Lab-Tek y se incubaron durante una noche a 37 °C. Después de la incubación durante una noche, el medio de cultivo se reemplazó con medio fresco antes de añadir las nanopartículas (2 µg por pocillo). Antes de la formación de imágenes, las células U87-Luc/GFP se trataron durante 15 min con Hoechst 34580 (5 µg/ml) para teñir el núcleo. Después de la incubación, las células se lavaron 3 veces con 1X PBS y se reemplazaron con Opti-MEM (Invitrogen Corp., Carlsbad, California). A continuación, se obtuvieron imágenes de células y nanopartículas bajo un microscopio confocal Zeiss LSM510 Meta (Carl Zeiss Inc., Thornwood, NY) utilizando una lente de inmersión en aceite 63X Plan-Apo/1.4 NA. Para la microscopía multicolor, las muestras se excitaban con líneas láser de 405, 488, 543 y 633 nm, y las imágenes se capturaron mediante seguimiento múltiple para evitar el sangrado entre fluoróforos.

Transporte de nanopartículas en cortes de cerebro de rata

La difusión de nanopartículas fluorescentes individuales en cortes de cerebro de rata se cuantificó mediante seguimiento de partículas múltiples (MPT) como se ha descrito previamente [34]. Brevemente, se sacrificaron ratas Sprague-Dawley (6-8 semanas), se extrajo el cerebro y se incubó en líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF, Tocris Bioscience, Bristol, RU) durante 10 min en hielo. El cerebro se cortó en secciones coronales de 1,5 mm utilizando un cortador de matriz de cerebro Zivic (Zivic Instruments, Pittsburgh, PA). Se añadieron los cortes a cámaras de portaobjetos de microscopio personalizadas y se inyectaron nanopartículas fluorescentes (0,5 µl de 20 µg/ml de soluciones madre) en el centro del tejido cortical. Los portaobjetos se sellaron con superpegamento y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante un mínimo de 15 min antes de obtener la imagen. Se obtuvieron imágenes del movimiento de nanopartículas individuales en cortes de cerebro, a una velocidad de fotograma de 15 fotogramas/s para un total de 300 fotogramas (20 s), utilizando un microscopio epi-fluorescente invertido (Axiovert D1, Zeiss, Thornwood, NY) con un objetivo de inmersión en aceite 100x/1,46 NA equipado con una cámara Evolve 512 EMCCD (Photometrics, Tucson, AZ). Las películas se analizaron utilizando un código de seguimiento automatizado MATLAB escrito a medida para extraer las coordenadas x, y de las nanopartículas en el tiempo, como se ha descrito previamente [40]. Se obtuvieron imágenes de al menos tres cerebros de rata por cada tipo de nanopartícula con al menos 100 partículas rastreadas por muestra. La media geométrica del desplazamiento cuadrático medio (MSD) se calculó por muestra y el promedio de los diferentes cerebros de roedor se calculó en función de la escala de tiempo [40, 41].

Implante intracraneal de tumores U87-Luc/GFP

Todos los procedimientos con animales se aprobaron por el University of Maryland Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) y la Office of Animal Welfare Assurance (OAWA). Se adquirieron ratones desnudos atímicos (6-8 semanas de edad) de la University of Maryland School of Medicine Veterinary Resources. Para el procedimiento de implantación del tumor, los animales se anestesiaron mediante un flujo continuo de isoflurano del 2 al 3 % a través de un cono nasal. Utilizando un marco estereotáxico y una técnica estéril, se inyectaron $\sim 4,0 \times 10^5$ células de GBM U87-Luc/GFP a una velocidad de 1 µl/min durante 5 min en el lóbulo frontal izquierdo del cerebro a través de un orificio de trépano; se perforó 2 mm lateral a la sutura sagital y 1 mm anterior a la sutura coronal a una profundidad de 3 mm por debajo de la duramadre. A los ratones se les administró el analgésico buprenorfina (Buprenex, 0,05 mg/kg, por vía subcutánea) después de la cirugía. Los animales se observaron diariamente para detectar cualquier signo de deterioro o disfunción neurológica. Si los síntomas persistieron y resultaron en debilitamiento, los animales se sacrificaron de acuerdo con el protocolo.

Obtención de imágenes de bioluminiscencia in vivo

Se obtuvieron imágenes de tumores de ratón U87-Luc/GFP intracraneales usando un sistema Xenogen IVIS (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). La anestesia se indujo en una cámara de inducción con isoflurano al 2,5 % en oxígeno al 100 % a un caudal de 1 l/min y se mantuvo en el sistema IVIS con una mezcla al 2,0 % a 0,5 l/min. A los ratones se les inyectó D-luciferina (150 mg/kg, por vía intraperitoneal; disuelta en PBS) y se devolvieron a sus jaulas de origen. Diez minutos después de la inyección de D-luciferina, se indujo la anestesia con isoflurano en una cámara de inducción. El animal se trasladó a la cámara de imágenes IVIS y se mantuvo con isoflurano del 2 al 3 %. Los fotones emitidos por ratones vivos se adquirieron como fotones/s/cm²/estereorradián (p/s/cm²/cm²/sr) y se analizaron utilizando el software LivingImage (PerkinElmer, MA).

Inyección intracraneal de nanopartículas

El día 7 después de la implantación de las células tumorales U87-Luc/GFP, se confirmó la señal bioluminiscente de los tumores cerebrales injertados en cada animal. Una vez que se confirmó la señal del tumor, los animales se anestesiaron como se ha descrito anteriormente y las nanopartículas suspendidas en solución salina normal se administraron de forma estéril en el cerebro de ratón (n = 3) a través del mismo orificio de trépano usando un marco estereotáxico. Se cargaron nanopartículas CNP y CNP-ITEM4 (alta) en solución salina normal en una aguja de jeringa Hamilton estéril de calibre 30, se bajaron a una profundidad de 3,5 mm y se inyectaron lentamente: 5 µl (0,1 mg/ml de nanopartículas) a una velocidad de 1 µl/min durante 5 min.

Distribución de nanopartículas en el cerebro y xenoinjerto de GBM humano intracraneal

Se evaluó la distribución y colocalización de nanopartículas fluorescentes con tumores U87-Luc/GFP en el cerebro mediante imágenes de criosecciones cerebrales. Los animales se sacrificaron con una sobredosis de isoflurano 24 h después de la inyección de nanopartículas. Los animales sacrificados se perfundieron con 30 ml de 1X PBS, después de lo cual se extrajeron cuidadosamente los cerebros, se incluyeron en la temperatura de corte óptima (OCT) y se almacenaron a -80 °C. Se utilizó un criostato (Leica CM3050 S) para cortar secciones cerebrales sagitales en serie de 10 µm y se montaron en portaobjetos de microscopio cargados positivamente. Las secciones de cerebro se tiñeron con antidecoloración Prolong Gold con o sin DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA), se sellaron con cubreobjetos y se tomaron imágenes de los núcleos celulares (azul oscuro), CNP (azul claro), tumores U87 positivos para GFP (verde), y nanopartículas CNP-ITEM4 (alta) (rojo) utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon con un aumento de 10x y 20x. Se obtuvieron imágenes unidas de alta resolución (6 x 6) utilizando la función de montaje de imágenes en el software Nikon NX 2. La configuración del microscopio se optimizó cuidadosamente para evitar la fluorescencia de

fondo basándose en cerebros de ratones de control no inyectados, donde el tiempo de exposición para cada canal se mantuvo constante durante todo el estudio.

Biodistribución de nanopartículas y direccionamiento específico de tumor al xenoinjerto de tumor de mama después de la administración sistémica

A ratones hembra Nu/Nu individuales (6-8 semanas de edad) se les inyectaron células MDA-MB-231/Luc Ctrl y MDA-MB-231/Luc Fn14 shRNA 448 en el costado izquierdo y derecho, respectivamente (1×10^6 células cada vez). El crecimiento del tumor se monitorizó mediante imágenes de bioluminiscencia (BLI) y medidas de calibre. Cuando cada tumor alcanzó un volumen de $\sim 100 \text{ mm}^3$, se administraron nanopartículas recubiertas no dirigidas (CNP) marcadas con infrarrojo cercano (NIR) o ITEM4-CNP a través de la vena de la cola. 72 horas después de la inyección, los ratones se sacrificaron y se diseccionaron. La sangre, los órganos (corazón, hígado, bazo, riñón, pulmón, estómago, intestino, útero, piel, músculo, hueso, cerebro) y los tumores se aislaron y se pusieron en una placa de Petri y se evaluaron para determinar la biodistribución y las capacidades de direccionamiento de tumor mediante imagen óptica cuantitativa.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante una prueba t de Student de dos colas asumiendo varianzas desiguales o análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de pruebas Tukey HSD o Games-Howell usando el software SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas a un nivel de $P < 0,05$.

Ejemplo 2: BPN

Estudios previos sugirieron que el espaciado de malla en el ECS cerebral no es mayor de $\sim 20\text{-}40 \text{ nm}$, y se ha mostrado un movimiento restringido de puntos cuánticos (QD) recubiertos con polietilenglicol (PEG) de 35 nm en el cerebro de rata [17, 26]. Se planteó la hipótesis de que la mala penetración del QD recubierto con PEG se debía a interacciones adhesivas entre los QD y la ECM debido a un recubrimiento inadecuado de PEG en las superficies del QD. Sin embargo, basándose en la experiencia con partículas que penetran el moco [28], se inyectaron partículas de poliestireno (PS) densamente recubiertas de $40\text{-}200 \text{ nm}$ con PEG de bajo peso molecular en cerebros de rata y a continuación se visualizó la dispersión de partículas. Las nanopartículas de PS no recubiertas no penetraron, mientras que el PS denso recubierto con PEG penetró $>100 \mu\text{m}$ más allá del sitio de inyección en tan solo 1 h. (Figura 1). Estas partículas recubiertas con PEG altamente denso se denominan "nanopartículas penetrantes del cerebro" (BPN) y las equivalentes no recubiertas "nanopartículas no recubiertas" (UCN).

Ejemplo 3: Fn14 se expresa en gran medida invadiendo células de GBM.

Fn14 se expresa mínimamente en el cerebro humano normal, pero se expresa en gran medida en gliomas de alto grado con características más neoplásicas e invasivas. Además, una alta expresión de Fn14 se correlaciona con un resultado deficiente del paciente [12]. Estos hallazgos sugieren un papel importante para Fn14 en la patobiología del GBM. Fn14 se sobreexpresa en células de GBM que invaden el parénquima cerebral normal [12, 13] (figura 2). En la Figura 2A, la tinción con hematoxilina y eosina del borde de un espécimen de biopsia de glioma maligno muestra el núcleo del tumor celular denso y las células tumorales infiltrantes en el borde del tumor. La microdissección de captura con láser en el borde del tumor en la Figura 2B seguido del aislamiento de ARN y la cuantificación de los niveles de ARNm de Fn14 utilizando la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real [rtPCR] muestra una expresión significativamente aumentada en las células invasoras. La sobreexpresión forzada de Fn14 en células de glioma estimuló tanto la migración como la invasión celular, lo que sugiere que las células tumorales con los niveles más altos de Fn14 en su superficie también pueden tener la mayor capacidad invasiva [12]. Estos hallazgos diferencian a Fn14 de otras dianas de GBM (es decir, EGFR, IL13R, tenascina C) e indican que Fn14 puede ser una molécula de superficie ideal para dirigirse a células de glioma maligno invasivo.

Ejemplo 4: Las BPN dirigidas a Fn14 muestran una unión específica a Fn14 fuerte, una unión no específica a la ECM mínima, una captación mejorada de células de glioblastoma, y una difusión cerebral sin cambios

Los datos demuestran que las BPN conjugadas con el anticuerpo monoclonal anti-Fn14 ITEM4 se unen a Fn14 inmovilizado pero no a componentes de la ECM del cerebro. En la figura 3A, el análisis SPR mide la unión al receptor Fn14: anticuerpo monoclonal ITEM4 libre, las BPN con densidades superficiales variables de ITEM4 y BPN no dirigidas. En la figura 3B, el análisis SPR mide la unión de NP y BPN de poliestireno no recubiertas con densidades superficiales variables de ITEM4 a la ECM del cerebro de ratón. El chip SPR de la ECM de cerebro se validó utilizando anticuerpos monoclonales que reconocen varios componentes de la ECM cerebral comunes. La figura 3C ilustra células de glioma humano U87 tratadas con BPN fluorescente o BPN conjugada con ITEM 4. La conjugación de ITEM4 (alta densidad) dio como resultado un aumento de $\sim 4,5$ veces en la unión de BPN a las células de glioma en cultivo, según lo medido por el seguimiento de partículas múltiples (MPT), un método que se desarrolló para cuantificar el movimiento no convectivo de cientos de nanopartículas individuales en ECS cerebral usando imágenes *in vivo* (figura 3C). Lo que es más importante, la conjugación de ITEM4 con la superficie de BPN no parece inhibir el movimiento de

las BPN en el tejido cerebral (figura 3D).

Ejemplo 5: Las células GBM44 derivadas de pacientes muestran una alta expresión de Fn14, invasión cerebral, y sensibilidad a TMZ.

Para evaluar si las BPN (con o sin direccionamiento de Fn14) permitirán una entrega y eficacia mejoradas en un modelo de GBM humano traslacionalmente relevante, se usó una línea celular de GBM derivada de paciente Fn14+ bien caracterizada denominada GBM44. Este modelo de PDX se generó inicialmente mediante la transferencia inmediata de tejido tumoral a ratones inmunodeficientes y se ha pasado a lo largo del tiempo como un tumor subcutáneo. Los modelos PDX de GBM mantienen las características histológicas y genéticas del tumor del paciente original durante el pase *in vivo*. Además, la naturaleza invasiva de las células de GBM humanas se recapitula en modelos de xenoinjerto PDX. La línea GBM44 PDX expresa altos niveles de Fn14 (figura 4A) y después de la inyección intracraneal invade el parénquima cerebral normal (figura 4B). El tumor Fn14+ GBM44 PDX también es susceptible al tratamiento con temozolomida (TMZ) (figura 4C), lo que sugiere que el sistema modelo tiene una relevancia traslacional significativa.

Ejemplo 6: Análisis de la expresión de Fn14 en tumores gliales humanos

El aumento de la expresión de Fn14 se correlaciona con un mayor grado de glioma y un tiempo de supervivencia más corto [12]. Se analizaron los niveles de transcripción de Fn14 en los especímenes de glioma y tejido normal de casos de epilepsia. Los datos también se compararon basándose en los tiempos de supervivencia mediante la clasificación de los pacientes en dos grupos: supervivencia a corto y largo plazo. Este análisis mostró que los pacientes con GBM de alta expresión de Fn14 no vivieron tanto tiempo. Los resultados también confirmaron la hipótesis de que el aumento de la expresión de Fn14 se encuentra en gliomas de mayor grado con características más malignas e invasivas. En la figura 5A-5B, el análisis de la expresión de Fn14 en tumores gliales humanos reveló (A) niveles de expresión de ARNm de Fn14 en 184 especímenes de tumores normales y cerebrales. El GBM mostró niveles de expresión de Fn14 significativamente más altos en comparación con cerebro no neoplásico (NB), oligoastrocitoma (OL) o astrocitoma anaplásico (AA) y (B) se analizaron los valores de expresión de ARNm de Fn14 en dos grupos. El grupo uno tuvo una media de supervivencia de 401 días (supervivencia a corto plazo) y el grupo dos tuvo una media de supervivencia de 952 días (supervivencia a largo plazo). Los niveles de expresión de Fn14 fueron significativamente más altos en el grupo de supervivencia a corto plazo.

Ejemplo 7: Los sistemas de administración que incluyen nanovectores poliméricos median la transferencia génica eficiente a células de glioma y tumores

Se diseñaron vectores nanogénicos poliméricos diseñados para proteger el ADN *in vivo* para permitir el tráfico celular y la expresión transgénica eficientes. Se probó la capacidad de desactivar un gen modelo en tumores cerebrales. Los nanovectores que contienen plásmido de ARNhc de luciferasa se aplicaron directamente a células de glioma que expresan luciferasa en cultivo y a tumores intracraneales (figura 6A-C). Los nanovectores entraron eficientemente en las células y silenciaron el transgén específico de tumor (luciferasa) *in vitro* e *in vivo*. Específicamente, los nanovectores (A) entraron de manera eficiente en las células de glioma de ratón [GL261] y, después de entrar en las células, (B) los nanovectores entregaron eficazmente una construcción génica plasmídica con un indicador verde fluorescente y ARN inhibidor para luciferasa (shLuc) a las células GL261 que expresan constitutivamente luciferasa GL261L. En la figura 6C, las BLI de células GL261L *in vivo* muestran un silenciamiento BLI significativo usando nanovectores que llevan el plásmido shLuc (línea discontinua).

Ejemplo 8: Fn14 se expresa altamente en líneas celulares de glioma

Para confirmar la expresión del gen Fn14 elevada en líneas celulares de glioma modelo, se evaluaron los niveles de ARNm de Fn14 en la figura 7. La figura 7 es una transferencia de Western que ilustra que Fn14 se expresa en líneas celulares de GBM. Se prepararon lisados de células totales a partir de diversas líneas celulares de GBM y se inmunotransfirieron cantidades iguales de proteína con anticuerpos anti-Fn14 y anti-tubulina. La expresión más alta de Fn14 se produjo en la línea celular A172.

Ejemplo 9: Formulación de vectores del gen BPN a base de PEI.

Las nanopartículas de PEG-PEI se formularon como se ha descrito previamente. [42]. Para las partículas de PEG-PEI con ligandos de direccionamiento, se conjugó primero PEG heterobifuncional, maleimida-PEG-succinimidil carboximetil éster con PEI ramificada, seguido de la conjugación del ligando a través del enlace tiol-maleimida. Los ligandos para esta etapa de conjugación pueden incluir: anticuerpo monoclonal TWEAK y Fn14 o fragmentos de anticuerpo. Los tipos de partículas pueden incluir PEG-PEI, dendrímero de PEG y PEG CK30. Las variables de formulación incluyen polímeros (PEI, PEI-PEG, dendrímero-PEG y CK30-PEG. El PEG puede tener un PM de densidad de revestimiento de 5 kDa a 10 kDa. Las concentraciones de polímero y los disolventes y tensioactivos están fácilmente disponibles y se conocen en la técnica. [43]-[44] Los métodos de caracterización pueden incluir dispersión de luz dinámica (tamaño y carga superficial neta), microscopía electrónica (confirmación de morfología y tamaño) y ensayos de unión fluorométrica y microscopía confocal (cuantificación de la densidad de PEG). Las tasas de transporte de partículas se

midieron analizando trayectorias de partículas fluorescentes, registradas mediante el uso de una cámara objetivo intensificada con silicio (Strome/Hanes Labs) montada en un microscopio de epifluorescencia invertido. El análisis de MPT en tejido cerebral se realizó como se ha descrito previamente. [34], Se cultivaron células de glioma Fn14+ U118 de bajo pase en cámaras de vidrio. Se añadieron a las células vectores del gen BPN dirigidos que contenían un plásmido indicador de GFP y se incubaron. Se utilizó microscopía confocal para evaluar la morfología celular (toxicidad) y contar las células GFP+ por campo de alta potencia (HPF) para comparar las tasas de transfección. Las células se tripsinizaron y se utilizó un análisis de citometría de flujo para cuantificar el porcentaje de transfección de GFP+ para cada de tratamiento.

Ejemplo 10: Distribución y transferencia de genes indicadores a través de BPN a células de glioma humano Fn14+ invasoras en un ensayo de migración de cortes de cerebro organotípico

Se formularon vectores génicos con características penetrantes del cerebro usando polímeros dibloque 5K PEG-PEI y ADN plasmídico marcado con fluorescencia. A continuación, estas partículas se coinyectaron con la BPN modelo en el cerebro de ratón vivo (figura 8). En la figura 8A, se inyectaron nanopartículas no recubiertas convencionales en el cerebro de ratón vivo mostrando una difusión o transporte mínimos. la BPN modelo optimizada en la figura 8B se distribuye rápidamente dentro del cerebro de ratón. En la figura 8C, los vectores del gen BPN también penetraron bien en el tejido cerebral. Una superposición en la figura 8D muestra BPN modelo y vectores de genes BPN que tienen una superposición cercana de los dos tipos de partículas.

Se usó microscopía de barrido láser para obtener imágenes de la dispersión de partículas usando un sistema de ratón de ventana craneal cerrada *in vivo*. Esto mostró una superposición de distribución casi exacta de los vectores génicos y las BPN modelo. Los vectores génicos BPN PEG-PEI marcados con fluorescencia también se analizaron *ex vivo* en cortes de cerebro frescos usando MPT (datos no mostrados). Este análisis se correlacionó bien con la comparación de imágenes *in vivo* que se muestra aquí. Estos resultados preliminares sugirieron la capacidad de producir con éxito vectores de genes BPN utilizando un sistema de vectores de genes poliméricos bien conocido y caracterizado.

Ejemplo 11: La proteína verde fluorescente que expresa células de glioma humano Fn14+ invade cortes de cerebro frescos

Se desarrolló un ensayo de migración de cortes de cerebro *ex vivo* usando células de glioblastoma humano Fn14+ GFP+ (U118) y cerebro de ratón fresco en condiciones de cultivo organotípico. La figura 9 muestra fotografías de células GFP+ U118 colocadas en cortes de cerebro de ratón frescos e incubadas durante 1, 24 y 48 horas. Para este análisis, se sacrificaron ratones C57BL/6 con isoflurano y dislocación cervical. Se extrajo el cerebro y se cortaron cortes de 400 µm de espesor (6-8/ratón) usando un vibratomo. A continuación, los cortes se colocaron en la parte superior de una cámara de membrana transwell llena de medio de cultivo celular (DMEM). La suspensión de células GFP+ U118 se puso encima de cada corte de cerebro, a continuación se incubó durante 24-48 h. La cuantificación implicó una breve fijación y a continuación microscopía confocal utilizando el software Volocity Image para calcular la profundidad de invasión de las células GFP+. Se configuró el ensayo de migración del corte de cerebro anterior y se mezclaron nanopartículas (indicador dsRED plasmídico) con las células GFP+ U118 en el momento de la colocación en el corte de cerebro. El análisis de imágenes incluyó microscopía confocal con mediciones de distancia y evaluaciones cualitativas de ubicaciones de partículas, ubicaciones de células y transfección de células. El tejido se digirió para crear una suspensión de células señal.

Ejemplo 12: Síntesis y caracterización de nanopartículas dirigidas a Fn14

Diversas "nanopartículas recubiertas" (CNP) penetrantes del tejido cerebral a base de poliestireno (PS) que estaban funcionalizadas en la superficie se sintetizaron con un anticuerpo bien caracterizado, ITEM4, que se une fuertemente a Fn14. Las condiciones de reacción, incluido el exceso molar de 2-iminotiolano con respecto a ITEM4 y la relación de maleimida-PEG5k-amina con respecto a metoxi-PEG5k-amina, se optimizaron para producir CNP con diferentes densidades superficiales de ITEM4 (figura 10A-10B). La cuantificación de la tiolación de ITEM4 y la densidad superficial de ITEM4 se midió mediante el kit de ensayo de cuantificación de tiol y el ensayo de proteína LavaPep, respectivamente.

Tres conjuntos de nanopartículas recubiertas con PEG: sin ITEM4 (CNP), decoradas con una baja densidad de ITEM4 (CNP-ITEM4 (baja)), o decoradas con una alta densidad de ITEM4 (CNP-ITEM4 (alta)) se compararon con las nanopartículas convencionales no recubiertas (UNP) (Tabla 2).

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de nanopartículas.

Formulación	Diámetro de partícula, (nm) ^a	potencial ζ, (mV) ^b	Densidad superficial de ITEM4, (N.º/partícula) ^c
UNP	95 ± 3	-54,6 ± 3,0	--

(continuación)

Formulación	Diámetro de partícula, (nm) ^a	potencial ζ , (mV) ^b	Densidad superficial de ITEM4, (N.º/partícula) ^c
CNP	113 $\pm$ 2	-7,0 $\pm$ 0,2	--
CNP-ITEM4 (baja)	113 $\pm$ 3	-8,7 $\pm$ 1,2	~11
CNP-ITEM4 (alta)	114 $\pm$ 22	-8,9 $\pm$ 0,7	~56
^a Diámetro (media numérica) medido por dispersión dinámica de luz. Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes $\pm$ DE. ^b Medido a 25 °C en PBS diluido 15X, pH 7,4. Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes $\pm$ DE. ^c Densidad superficial informada del ensayo de proteína fluorescente LavaPep.			

CNP, CNP-ITEM4 (baja) y CNP-ITEM4 (alta) exhibieron diámetros hidrodinámicos mayores y un potencial ζ neutro más cercano en comparación con UNP, como se esperaba para nanopartículas con recubrimientos PEG denso. CNP-ITEM4 (baja) y CNP-ITEM4 (alta) mostraron una carga superficial ligeramente más negativa en comparación con CNP.

5 El número de moléculas ITEM4 se cuantificó en la superficie de las nanopartículas y se determinó que había ~11 y ~56 moléculas ITEM4 por partícula para las nanopartículas CNP-ITEM4 (baja) y CNP-ITEM4 (alta), respectivamente.

Ejemplo 13: Cribado Biacore de nanopartículas para la unión a Fn14

10 Para probar la capacidad de las nanopartículas CNP-ITEM4 para unirse a Fn14, se funcionalizó el dominio extracelular de Fn14 en la superficie de un chip Biacore. El análisis SPR se usó para medir la unión de nanopartículas y anticuerpos al dominio extracelular de Fn14: La figura 11A ilustra ITEM4 libre y ITEM4 modificado con tiol (ITEM4-SH) y la figura 11B ilustra nanopartículas CNP y CNP-ITEM4 con dos densidades superficiales diferentes de ITEM4. Se midió la unión de formulaciones de ITEM4 (sin modificar), ITEM4-SH (modificado con tiol para la conjugación superficial a nanopartículas), y CNP con diferentes densidades superficiales de ITEM4. ITEM4 y ITEM4-SH se unieron de forma similar, lo que indica que la modificación con tiol de ITEM4 no afecta significativamente a la actividad de unión de ITEM4 a Fn14 (figura 11A). La CNP no mostró una unión de Fn14 apreciable, mientras que tanto CNP-ITEM4 (baja) como CNP-ITEM4 (alta) mostraron una unión de Fn14 significativa en el chip (figura 11B).

20 Además, la unión de nanopartículas CNP-ITEM4 al chip fue proporcional a la densidad superficial de ITEM4, ya que CNP-ITEM4 (alta) exhibió una unión más fuerte en comparación con CNP-ITEM4 (baja). Para confirmar la especificidad de la unión de CNP-ITEM4 al chip Fn14 Biacore, primero se bloquearon los sitios de unión de Fn14 disponibles con un exceso de ITEM4 (500 nM) (figura 12A), después de lo cual se permitió que las partículas de CNP-ITEM4 (alta) se unieran al chip (figura 12B). CNP-ITEM4 (alta) se unió al chip Fn14 Biacore que se pretrató con IgG de control, pero no al chip tratado con exceso de ITEM4 (figuras 12A-12B). Para cuantificar la unión de diversas formulaciones de CNP-ITEM4 al dominio extracelular de Fn14, se determinaron sus afinidades de unión (K_D) midiendo la unión a diversas concentraciones. Los datos de unión y los procedimientos de ajuste apropiados para ITEM4 y ITEM4-SH se proporcionan en las figuras 13A-13C. Las figuras 13A-13C son gráficos que ilustran la caracterización de la unión de ITEM4 a Fn14. El análisis SPR en la figura 13A ilustra el ITEM4 y en la figura 13C la unión de ITEM4-SH a diversas concentraciones. En la figura 13C, las afinidades de unión de equilibrio para ITEM4 y ITEM4-SH se calcularon a partir de los datos de SPR de ajuste.

La caracterización de la unión de nanopartículas CNP-ITEM4 a Fn14 se ilustra en las figuras 14A-14B. La K_D medida para CNP-ITEM4 (baja) y CNP-ITEM4 (alta) fue 106 pM (figura 14A) y 24 pM, (figura 14B), respectivamente. Eran ~15 y ~65 veces más altas que la afinidad de unión de ITEM4 en solitario. Los valores de K_D representados en tabla para las diversas formulaciones de ITEM4 y CNP se proporcionan en la Tabla 3.

Tabla 3. Afinidades de unión (K_D) de nanopartículas al dominio extracelular de Fn14.

Analito	K_D , (nM) ^a
ITEM4	1,62
ITEM4-SH	1,57
CNP-ITEM4 (baja)	0,106
CNP-ITEM4 (alta)	0,024
^a Valores de K_D determinados por nanopartículas a partir del ajuste de los datos de Biacore.	

40 Ejemplo 14: Cribado Biacore de nanopartículas para la unión no específica a proteínas de la ECM cerebral

Para cribar nanopartículas en busca de unión no específica a la ECM cerebral, se funcionalizaron componentes de la ECM del cerebro de ratón en la superficie de un chip Biacore y se evaluó la unión de diversas formulaciones de nanopartículas. Como control positivo, se midió la unión no específica de nanopartículas no recubiertas (UNP), ya que anteriormente se había demostrado que estas partículas estaban casi completamente inmovilizadas cuando se administraban al cerebro de los roedores [34]. Las UNP se unieron fuertemente a la superficie del chip ECM Biacore

(figura 15A-15B), y estas partículas no se desorbieron apreciablemente del chip con los procedimientos de regeneración Biacore estándar (datos no mostrados). Por lo tanto, se utilizó un chip ECM Biacore recién preparado para el resto de los experimentos. Ninguna de las formulaciones de CNP que se estudian (CNP, CNP-ITEM4 (baja) y CNP-ITEM4 (alta)) se unió de manera apreciable al chip ECM, lo que sugiere interacciones mínimas no específicas entre las nanopartículas y las proteínas de la ECM del cerebro.

Ejemplo 15: Captación de nanopartículas en células negativas para Fn14 y positivas para Fn14

Para confirmar los resultados de unión de nanopartículas CNP-ITEM4 del ensayo Biacore, se midió la captación celular de las formulaciones de CNP mediante citometría de flujo. En primer lugar, se midió la captación de CNP-ITEM4 con dos líneas celulares de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF): MEF 3.5 -/- y MEF Fn14-V5. Las células MEF 3.5 -/- se generaron a partir de ratones sin Fn14 y, por lo tanto, no expresan Fn14, según se ensayó mediante análisis de transferencia de Western (figura 16A) o citometría de flujo (figura 16B). Las células MEF Fn14-V5 se produjeron mediante infección de la línea celular MEF 3.5 -/- con un lentivirus que codifica Fn14 humano. La expresión de Fn14 en estas células se confirmó mediante ensayos de transferencia de Western y citometría de flujo (figuras 16A-16B). La captación de nanopartículas CNP-ITEM4 por las líneas celulares MEF se determinó mediante citometría de flujo. No hubo diferencia en la captación celular entre CNP y CNP-ITEM4 (alta) en células MEF 3.5 -/-; por el contrario, la captación de CNP-ITEM4 (alta) fue ~2,5 veces mayor que la captación de CNP cuando estas nanopartículas se añadieron a las células MEF Fn14-V5 (figura 16C).

En segundo lugar, se examinó la captación de nanopartículas en células de GBM U87-Luc/GFP humanas. Estas células expresan Fn14, según se mide mediante transferencia de Western (datos no mostrados) y citometría de flujo (figura 17A). Se observó un aumento estadísticamente significativo en la captación de CNP en estas células con el aumento de la densidad de ITEM4 (figura 17B). Específicamente, la eficiencia de captación celular de CNP-ITEM4 (baja) y CNP-ITEM4 (alta) fue ~1,25 veces y ~3,5 veces mayor, respectivamente, en comparación con CNP en solitario. Para probar si la captación mejorada de CNP-ITEM4 era el resultado de una interacción específica entre ITEM4 y Fn14, se examinó un ensayo de inhibición competitiva con anticuerpo ITEM4 libre. La adición de ITEM4 libre en exceso a las células, antes de la adición de partículas, inhibió significativamente la captación de CNP-ITEM4 (alta) a los mismos niveles que los observados para la CNP no dirigida (figura 17C). Por el contrario, no se observó inhibición de la captación de CNP-ITEM4 cuando se preincubó la misma cantidad de proteína de control de isotipo de IgG con células U87-Luc/GFP. Para confirmar que las nanopartículas CNP-ITEM4 se internalizaron dentro de las células y no se asociaron únicamente con Fn14 en la superficie celular, se realizaron imágenes de microscopía confocal de células vivas (figuras 17D-17G). La localización intracelular de CNP-ITEM4 se confirmó mediante análisis de pila z de células teñidas con Hoechst 34580 (figura 17G).

Ejemplo 16: Transporte de nanopartículas en tejido cerebral

Se usó MPT para probar las velocidades de difusión de nanopartículas individuales en cortes de cerebro de rata *ex vivo*. Las trayectorias representativas de nanopartículas se muestran en la figura 18A, de la que se desprende que las UNP estaban inmovilizadas en tejido cerebral. Por el contrario, las tres formulaciones de CNP probadas, CNP, CNP-ITEM4 (baja) y CNP-ITEM4 (alta), exhibieron trayectorias de tipo browniano más difusivas. Esto se puede observar cuantitativamente por el desplazamiento ascendente en la curva MSD frente a la escala de tiempo (τ) para CNP, CNP-ITEM4 (baja) y CNP-ITEM4 (alta) en comparación con una UNP (figura 18B). El MSD calculado en una escala de tiempo (τ) = 1 s para las formulaciones de CNP fueron más de un orden de magnitud mayor que UNP (figura 18C). La diferencia en el MSD calculado (en τ = 1) entre UNP y todas las formulaciones de CNP fue estadísticamente significativa; sin embargo, no hubo diferencia estadística entre CNP, CNP-ITEM4 (baja) y CNP-ITEM4 (alta). Se estimó el número de partículas inmovilizadas para cada una de las formulaciones de nanopartículas basándose en los datos de transporte de MPT (figura 19).

El porcentaje de partículas se clasificó como inmovilizado si los valores de MSD mostrados en una escala de tiempo (τ) de 1 segundo eran menores que el MSD para una partícula que se ha movido un diámetro de partícula desde su posición inicial. Casi ~90 % de las UNP se inmovilizaron eficazmente en el tejido cerebral, mientras que solo del 25 al 45 % de las CNP permanecieron inmóviles, dependiendo de la formulación; sin embargo, solo se observó una diferencia estadísticamente significativa entre UNP y CNP-ITEM4 (alta).

Ejemplo 17: Distribución de nanopartículas después de la administración intracraneal en xenoinjertos de GBM humanos

Para probar el rendimiento de nanopartículas dirigidas a Fn14 *in vivo*, se administraron nanopartículas fluorescentes - CNP y CNP-ITEM4 (alta) - a ratones desnudos atímicos portadores de tumores de GBM U87-Luc/GFP ortotópicos. Las células tumorales U87 que expresaban luciferasa y GFP fueron evidentes en el cerebro 7 días después de la implantación del tumor (figuras 20A-20B). Las nanopartículas CNP y CNP-ITEM4 (alta) se inyectaron conjuntamente en las mismas coordenadas estereotóxicas que se utilizaron para la implantación de células tumorales. Los ratones se sacrificaron 24 h después de la inyección de nanopartículas y se aislaron los cerebros. Se prepararon criosecciones y se realizaron imágenes para evaluar la distribución tisular de las nanopartículas y la localización conjunta con las células tumorales cerebrales que expresan GFP (figuras 21A-21D). Las nanopartículas CNP y CNP-ITEM4 (alta) se

distribuyeron ambas uniformemente en el cerebro; sin embargo, se encontró una mayor asociación de CNP-ITEM4 (alta) con células tumorales de expresión de GFP en comparación con CNP no dirigidas (figura 21D). Estos resultados demuestran que esta CNP-ITEM4 puede penetrar dentro del tejido cerebral y dirigirse selectivamente a tumores de GBM experimentales remotos.

Ejemplo 18: Biodistribución de nanopartículas de PS-PEG recubiertas no dirigidas y dirigidas a Fn14 después de la administración sistémica en ratones portadores de tumor

Se implantaron por vía subcutánea células de luciferasa MDA-MB-231 positivas para Fn14 o negativas para Fn14 en el costado derecho o izquierdo, respectivamente, de ratones inmunodeficientes (figura 22A). El crecimiento tumoral se monitorizó mediante imágenes de bioluminiscencia (BLI), y cuando los tumores fueron claramente visibles, se inyectaron nanopartículas recubiertas no dirigidas o nanopartículas recubiertas conjugadas con ITEM4 a través de la vena de la cola. A los 3 días, después de la inyección, los ratones se sacrificaron y los órganos y tumores se aislaron y colocaron en una placa de Petri. La distribución de nanopartículas se analizó mediante BLI. Se muestran los resultados para las partículas no dirigidas (figura 22B) y las partículas dirigidas a Fn14 (figura 22C). Leyenda del tumor: Círculo de color negro = tumor Fn14+; Cuadrado punteado = tumor Fn14-. Leyenda de órganos: 1 = hueso, 2 = músculo, 3 = cerebro, 4 = pulmón, 5 = hígado, 6 = corazón; 7 = riñón; 8 = estómago, 9 = intestino, 10 = útero, y 11 = bazo.

REFERENCIAS

[1] Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

[2] Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992, and Supplements to 2002).

[3] Harlow and Lan, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990).

[4] Principles of Neural Science, 4th ed., Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell editors. McGraw-Hill/Appleton & Lange: New York, N. Y. (2000).

[5] Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary D, Tessier-Lavigne M. APP binds DR6 to cause axon pruning and neuron death via distinct caspases. Nature. 19 February 2009; 457 (7232): 981-989. doi:10.1038/nature07767. PMID 19225519.).

[6] Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders, 2004, 3, 153-160 2004 Bentham Science Publishers Ltd; and Programmed Axon Death, Synaptic Dysfunction and the Ubiquitin Proteasome System M.P. Coleman¹ and R.R. Ribchester.)

[7] Bonelli and Hofmann (2004), Expert Opin Pharmacother, 5, 767-76).

[8] Karpuj, et al. (2002), Nat Med, 8, 143-9).

[9] Fauci, A. S. et al., Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, 14th Edition (1998), page 2321.

[10] Winkles, J.A., The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. Nat Rev Drug Discov, 2008. 7(5): p. 411-25.

[11] Cheng, E., et al., TWEAK/Fn14 Axis-Targeted Therapeutics: Moving Basic Science Discoveries to the Clinic. Front Immunol, 2013. 4: p. 473.

[12] Tran, N.L., et al., Increased fibroblast growth factor-inducible 14 expression levels promote glioma cell invasion via Rac1 and nuclear factor-kappaB and correlate with poor patient outcome. Cancer Res, 2006. 66(19): p. 9535-42.

[13] Fortin, S.P., et al., Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis stimulation of glioma cell survival is dependent on Akt2 function. Mol Cancer Res, 2009. 7(11): p. 1871-81.

[14] Zhou, H., et al., The TWEAK receptor Fn14 is a therapeutic target in melanoma: immunotoxins targeting Fn14 receptor for malignant melanoma treatment. J Invest Dermatol, 2013. 133(4): p. 1052-62.

[15] Zhou, H., et al., Development and characterization of a potent immunoconjugate targeting the Fn14 receptor on solid tumor cells. Mol Cancer Ther, 2011. 10(7): p. 1276-88.

- [16] Zhou, H., et al., Antitumor activity of a humanized, bivalent immunotoxin targeting fn 14-positive solid tumors. *Cancer Res*, 2013. 73(14): p. 4439-50.
- 5 [17] Sampson, J.H., et al., Poor drug distribution as a possible explanation for the results of the PRECISE trial. *J Neurosurg*, 2010. 113(2): p. 301-9.
- [18] Tobias, A., et al., The art of gene therapy for glioma: a review of the challenging road to the bedside. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2013. 84(2): p. 213-22.
- 10 [19] Zhou, J., et al., Highly penetrative, drug-loaded nanocarriers improve treatment of glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(29): p. 11751-6.
- [20] Voges, J., et al., Clinical protocol. Liposomal gene therapy with the herpes simplex thymidine kinase gene/ganciclovir system for the treatment of glioblastoma multiforme. *Hum Gene Ther*, 2002. 13(5): p. 675-85.
- 15 [21] Voges, J., et al., Imaging-guided convection-enhanced delivery and gene therapy of glioblastoma. *Ann Neurol*, 2003. 54(4): p. 479-87.
- [22] Woodworth, G.F., et al., Emerging insights into barriers to effective brain tumor therapeutics. *Front Oncol*, 2014. 4: p. 126.
- 20 [23] Tzeng, S.Y. and J.J. Green, Therapeutic nanomedicine for brain cancer. *Ther Deliv*, 2013. 4(6): p. 687-704.
- [24] Veisheh, O., et al., Specific targeting of brain tumors with an optical/magnetic resonance imaging nanoprobe across the blood-brain barrier. *Cancer Res*, 2009. 69(15): p. 6200-7.
- 25 [25] Madhankumar, A.B., et al., Interleukin-13 receptor-targeted nanovesicles are a potential therapy for glioblastoma multiforme. *Mol Cancer Ther*, 2006. 5(12): p. 3162-9.
- [26] Sykova, E. and C. Nicholson, Diffusion in brain extracellular space. *Physiol Rev*, 2008. 88(4): p. 1277-340.
- 30 [27] Zimmermann, D.R. and M.T. Dours-Zimmermann, Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem Cell Biol*, 2008. 130(4): p. 635-53.
- [28] Vargova, L., et al., Diffusion parameters of the extracellular space in human gliomas. *Glia*, 2003. 42(1): p. 77-88.
- 35 [29] Willis, A.L., et al., The fibroblast growth factor-inducible 14 receptor is highly expressed in HER2-positive breast tumors and regulates breast cancer cell invasive capacity. *Mol Cancer Res*, 2008. 6(5): p. 725-34.
- 40 [30] Yin, J., et al., AR-Regulated TWEAK-FN14 Pathway Promotes Prostate Cancer Bone Metastasis. *Cancer Res*, 2014. 74(16): p. 4306-17.
- [31] Whitsett, T.G., et al., Elevated expression of Fn14 in non-small cell lung cancer correlates with activated EGFR and promotes tumor cell migration and invasion. *Am J Pathol*, 2012. 181(1): p. 111-20.
- 45 [32] Lai, S.K., et al., Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(5): p. 1482-7.
- [33] Popielarski, S.R., S.H. Pun, and M.E. Davis, A nanoparticle-based model delivery system to guide the rational design of gene delivery to the liver. 1. Synthesis and characterization. *Bioconjug Chem*, 2005. 16(5): p. 1063-70.
- 50 [34] Nance, E.A., et al., A dense poly(ethylene glycol) coating improves penetration of large polymeric nanoparticles within brain tissue. *Sci Transl Med*, 2012. 4(149): p. 149ra119.
- 55 [35] Bobo, R.H., et al., Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(6): p. 2076-80.
- [36] Kunwar, S., et al., Phase III randomized trial of CED of IL13-PE38QQR vs Gliadel wafers for recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol*, 2010. 12(8): p. 871-81.
- 60 [37] Brown, S.A., et al., TWEAK binding to the Fn14 cysteine-rich domain depends on charged residues located in both the A1 and D2 modules. *Biochem J*, 2006. 397(2): p. 297-304.
- [38] Medberry, C.J., et al., Hydrogels derived from central nervous system extracellular matrix. *Biomaterials*, 2013. 34(4): p. 1033-40.
- 65

[39] Gurunathan, S., et al., Regulation of fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14) expression levels via ligand-independent lysosomal degradation. *J Biol Chem*, 2014. 289(19): p. 12976-88.

[40] Schuster, B.S., et al., Overcoming the Cystic Fibrosis Sputum Barrier to Leading Adeno-associated Virus Gene Therapy Vectors. *Mol Ther*, 2014. 22(8): p. 1484-93.

[41] Kim, A.J., et al., "Highly compacted pH-responsive DNA nanoparticles mediate transgene silencing in experimental glioma", *J. Mater. Chem. B*, 2014, 2, 8165-8173, (2014)

[42] Dhruv, H., et al., Structural basis and targeting of the interaction between fibroblast growth factor-inducible 14 and tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis. *J Biol Chem*, 2013. 288(45): p. 32261-76.

[43] Stupp, R., et al., Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 2005. 352(10): p. 987-96.

[44] Fung, L.K., et al., Chemotherapeutic drugs released from polymers: distribution of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in the rat brain. *Pharm Res*, 1996. 13(5): p. 671-82.

[45] S.Y. Feng, Y. Guo, V.M. Factor, S.S. Thorgeirsson, D.W. Bell, J.R. Testa, et al., The Fn14 immediate-early response gene is induced during liver regeneration and highly expressed in both human and murine hepatocellular carcinomas, *Am. J. Pathol.* 156 (2000) 1253-1261.

[46] J.S. Michaelson, S. Cho, B. Browning, T.S. Zheng, J.M. Lincecum, M.Z. Wang, et al., Tweak induces mammary epithelial branching morphogenesis, *Oncogene* 24 (2005) 2613-2624.

[47] Hadjipanayis, C.G., et al., EGFRvIII antibody-conjugated iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging-guided convection-enhanced delivery and targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Res*, 2010. 70(15): p. 6303-12.

[48] Pang, Z., et al., Enhanced intracellular delivery and chemotherapy for glioma rats by transferrin-conjugated biodegradable polymersomes loaded with doxorubicin. *Bioconjug Chem*, 2011. 22(6): p. 1171-80.

[49] Reardon, D.A., et al., Phase II trial of murine (131)I-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 administered into surgically created resection cavities of patients with newly diagnosed malignant gliomas. *J Clin Oncol*, 2002. 20(5): p. 1389-97.

[50] Rich, J.N. and D.D. Bigner, Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant glioma. *Nat Rev Drug Discov*, 2004. 3(5): p. 430-46.

[51] Sampson, J.H., et al., Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol*, 2010. 28(31): p. 4722-9.

[52] Kim, A.J., et al., Use of single-site-functionalized PEG dendrons to prepare gene vectors that penetrate human mucus barriers. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013. 52(14): p. 3985-8.

[53] Ensign, L.M., et al., Mucus-penetrating nanoparticles for vaginal drug delivery protect against herpes simplex virus. *Sci Transl Med*, 2012. 4(138): p. 138ra79.

[54] Meighan-Mantha RL, Hsu DKW, Guo Y, Brown SAN, Feng SY, Peifley KA, Alberts GF, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Richards CM and Winkles JA. (1999). The mitogen-inducible Fn14 gene encodes a type I transmembrane protein that modulates fibroblast adhesion and migration. *J Biol Chem* 274:33166-33176.

[55] Bruce, J.N., et al., Regression of recurrent malignant gliomas with convection-enhanced delivery of topotecan. *Neurosurgery*, 2011. 69(6): p. 1272-9; discussion 1279-80.

[56] Playfer, J. R., Parkinson's Disease, *Postgrad Med J*, 73;257-264:1997 and Nadeau, S. E., Parkinson's Disease, *J Am Ger Soc*, 45;233-240:1997.

[57] Nakayama, M., et al., Fibroblast growth factor-inducible 14 mediates multiple pathways of TWEAK-induced cell death. *J Immunol*, 2003.170(1): p. 341-8.

[58] Wen, P.Y. and S. Kesari, Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*, 2008. 359(5): p. 492-507.

[59] Brem, H., et al., Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by

biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain Tumor Treatment Group. Lancet, 1995. 345(8956): p. 1008-12.

[60] Tate, M.C. and M.K. Aghi, Biology of angiogenesis and invasion in glioma. Neurotherapeutics, 2009. 6(3): p. 447-57.

[61] Jain, K.K., Nanobiotechnology-based strategies for crossing the blood-brain barrier. Nanomedicine (Lond), 2012. 7(8): p. 1225-33.

[62] Ulbrich, K., et al., Transferrin- and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood-brain barrier (BBB). Eur J Pharm Biopharm, 2009. 71(2): p. 251-6.

[63] Vykhodtseva, N., N. McDannold, and K. Hynynen, Progress and problems in the application of focused ultrasound for blood-brain barrier disruption. Ultrasonics, 2008. 48(4): p. 279-96.

[64] Nance, E., et al., Non-invasive delivery of stealth, brain-penetrating nanoparticles across the blood-brain barrier using MRI-guided focused ultrasound. J Control Release, 2014. 189: p. 123-32.

[65] Kroll, R.A. and E.A. Neuwelt, Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. Neurosurgery, 1998. 42(5): p. 1083-99; discussion 1099-100.

[66] Allard, E., C. Passirani, and J.P. Benoit, Convection-enhanced delivery of nanocarriers for the treatment of brain tumors. Biomaterials, 2009. 30(12): p. 2302-18.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSITY OF MARYLAND, BALTIMORE
THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY
WOODWORTH et al.

<120> SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN DIRIGIDA DE PARTICULADO ESPECÍFICOS DE ESTRUCTURA

<130> PE958455EP

<140> PCT/US15/61853
<141> 20/11/2015

<150> US 62/083.011
<151> 21/11/2014

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 129
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Fn14 humano

<400> 1

ES 2 832 802 T3

Met Ala Arg Gly Ser Leu Arg Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Leu Gly
1 5 10 15

Leu Trp Leu Ala Leu Leu Arg Ser Val Ala Gly Glu Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
35 40 45

Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
50 55 60

Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg Leu Leu Trp Pro
65 70 75 80

Ile Leu Gly Gly Ala Leu Ser Leu Thr Phe Val Leu Gly Leu Leu Ser
85 90 95

Gly Phe Leu Val Trp Arg Arg Cys Arg Arg Arg Glu Lys Phe Thr Thr
100 105 110

Pro Ile Glu Glu Thr Gly Gly Glu Gly Cys Pro Ala Val Ala Leu Ile
115 120 125

Gln

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de administración dirigida basado en el particulado específico de una estructura, que comprende:

- 5 (a) una nanopartícula que tiene un diámetro de 120 nm, 130 nm, 140 nm, 150 nm, 160 nm, 170 nm, 180 nm o 190 nm;
 (b) un recubrimiento de polímero de polietilenglicol (PEG) sobre la superficie de la nanopartícula que tiene una densidad superficial de al menos 0,1 moléculas de PEG por nm² y una corona de PEG con una densidad de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,10 g/cm³ y configurada para evitar una unión no específica a la matriz extracelular y para penetrar en la matriz extracelular;
 10 (c) un anticuerpo monoclonal Fn14 o un fragmento del mismo conjugado en una superficie de la nanopartícula y configurado para promover la unión específica a una molécula de la superficie celular expresada por una célula diana; y
 (d) un agente terapéutico en o sobre la nanopartícula.

15 2. El sistema de administración dirigida basado en particulado específico de una estructura de la reivindicación 1, en el que la célula diana es una célula tumoral, tal como en donde la célula tumoral procede de células seleccionadas del grupo que consiste en vejiga, cerebro, tal como un glioblastoma, mama, cuello del útero, colorrectal, esófago, hígado, pulmón, piel, ovario, páncreas, próstata, riñón, testículo, hueso, hígado y ganglio linfático.

20 3. El sistema de administración dirigida basado en el particulado específico de una estructura de la reivindicación 1, en el que la nanopartícula está formulada para inyección directa en el cerebro.

25 4. El sistema de administración dirigida basado en el particulado específico de una estructura de la reivindicación 1, en el que la nanopartícula está formulada para administración intracraneal.

5. El sistema de administración dirigida basado en el particulado específico de una estructura de la reivindicación 1, en el que la nanopartícula se forma a partir de un polímero biodegradable y el agente terapéuticamente activo está encapsulado dentro de la nanopartícula o está asociado a la superficie de la nanopartícula, opcionalmente en donde el polímero biodegradable se selecciona del grupo que consiste en: poli-DL-lactida-co-glicolida (PLGA); ácido poliláctico (PLA); poli-ε-caprolactona (PCL); quitosano, gelatina, albúmina y polialquil-cianoacrilatos (PAC).
 30

6. El sistema de administración dirigida basado en el particulado específico de una estructura de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo Fn14 se selecciona del grupo que consiste en: ITEM4, ITEM-4-SH, ITEM4 scFv e ITEM4 Fab.
 35

7. El sistema de administración dirigida basado en el particulado específico de una estructura de la reivindicación 1, en el que el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, doxorrubicina, etopósido y paclitaxel.

40 8. El sistema de administración dirigida basado en el particulado específico de una estructura de la reivindicación 1, en el que la nanopartícula tiene una corona de PEG con una densidad de aproximadamente 0,065 g/cm³.

9. El sistema de administración dirigida basado en el particulado específico de una estructura de la reivindicación 1, en el que la nanopartícula libera una cantidad eficaz del agente terapéuticamente activo durante un periodo de al menos cuatro horas.
 45

10. El sistema de administración dirigida basado en el particulado específico de una estructura de cualquier reivindicación anterior para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o un trastorno del cerebro.

50 11. La administración dirigida basada en el particulado específico de una estructura para su uso en el método de la reivindicación 10, en donde la enfermedad o el trastorno del cerebro se seleccionan del grupo que consiste en tumores, trastornos neurológicos, enfermedades neurodegenerativas, lesión o traumatismo cerebral, opcionalmente en donde la enfermedad o el trastorno del cerebro son un glioblastoma.

55 12. Una composición farmacéutica que comprende el sistema de administración dirigida basado en el particulado específico de una estructura de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un excipiente farmacéuticamente aceptable para su administración.

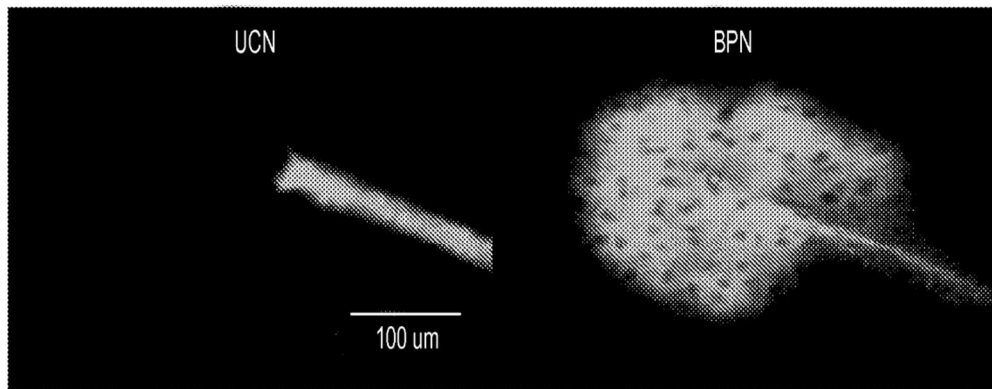


FIG. 1

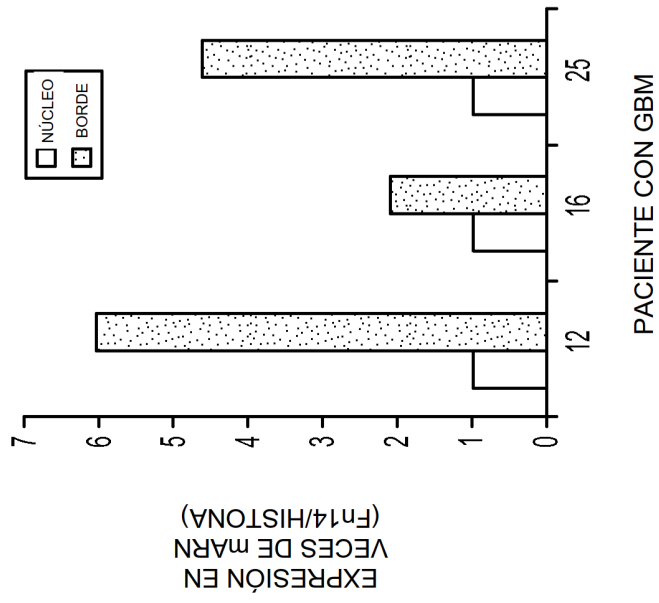


FIG. 2B

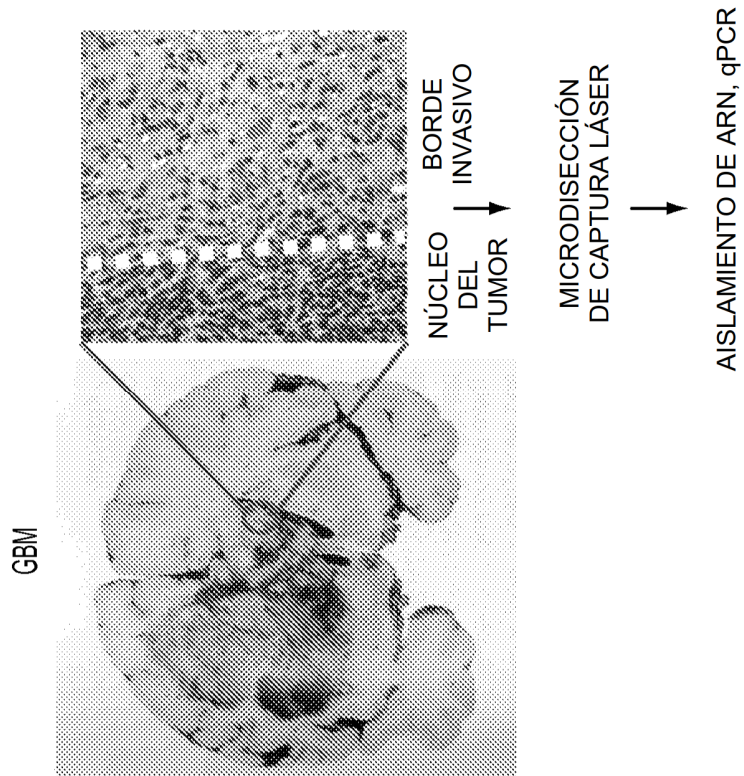


FIG. 2A

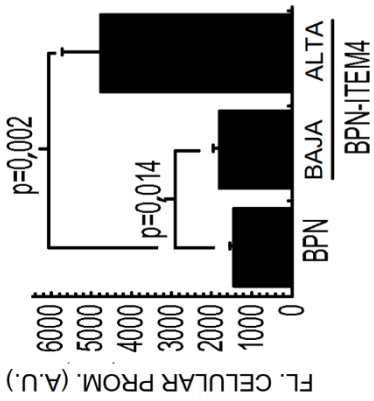


FIG. 3C

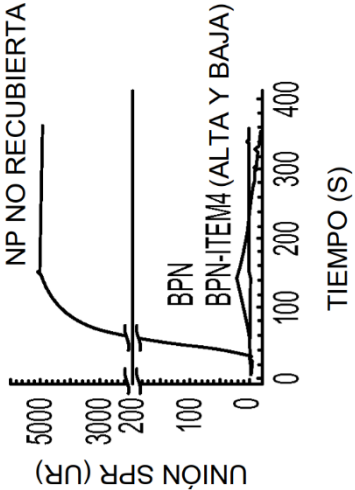


FIG. 3B

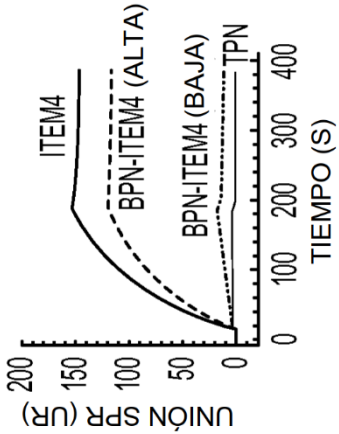


FIG. 3A

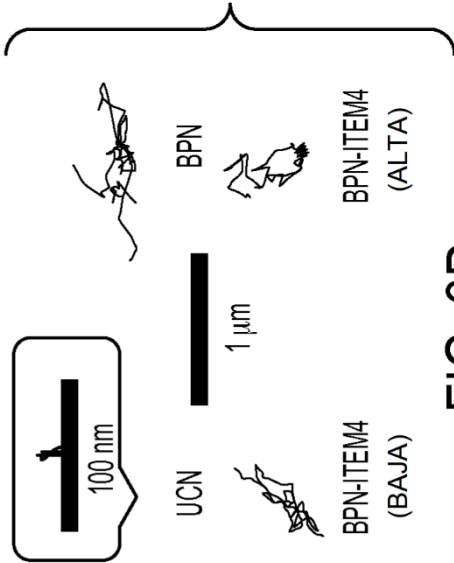


FIG. 3D

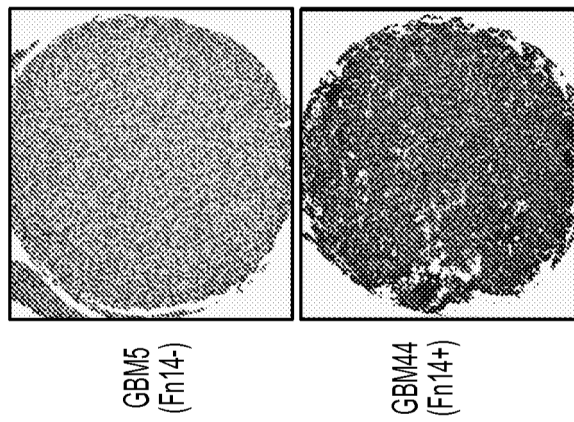


FIG. 4A

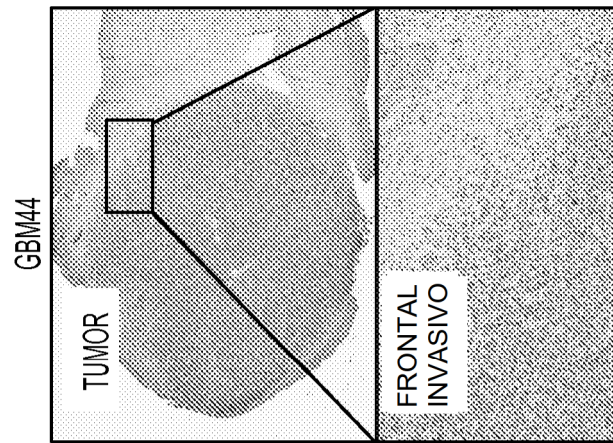


FIG. 4B

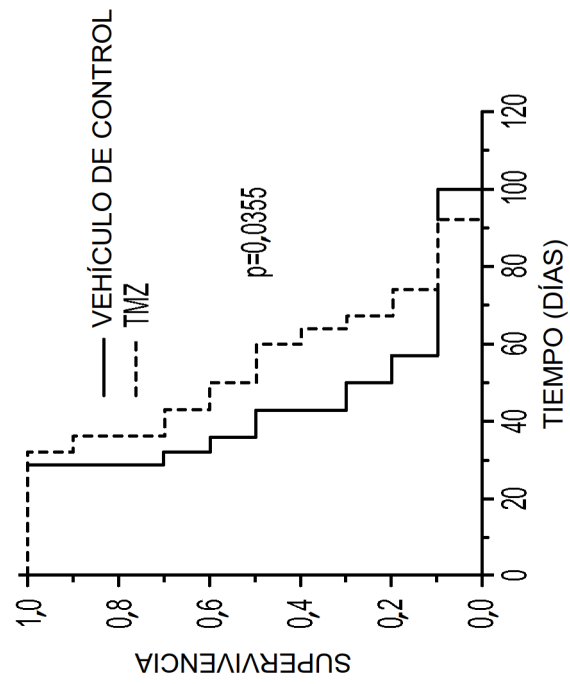


FIG. 4C

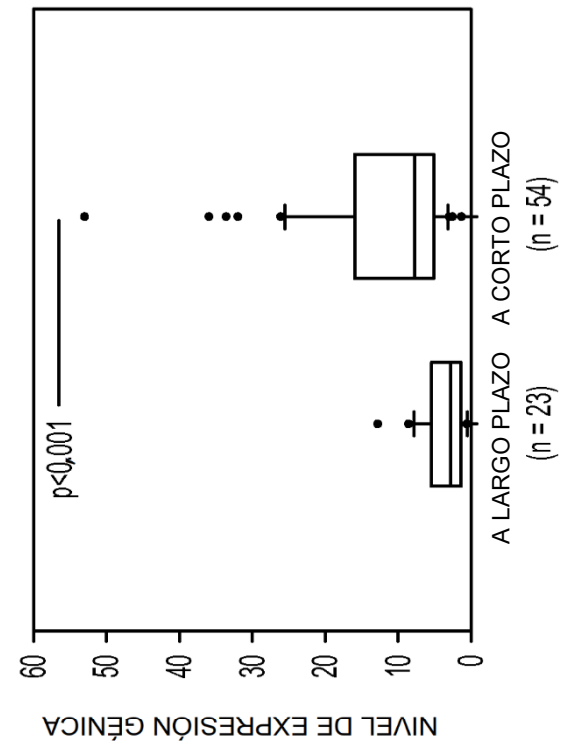


FIG. 5B

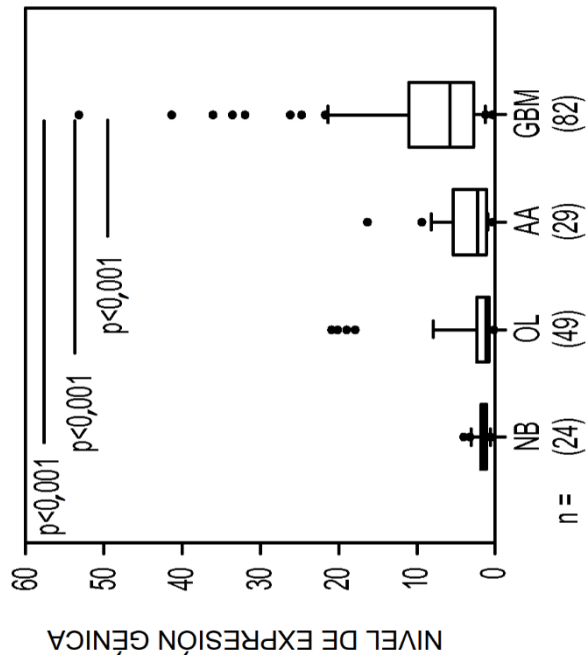


FIG. 5A

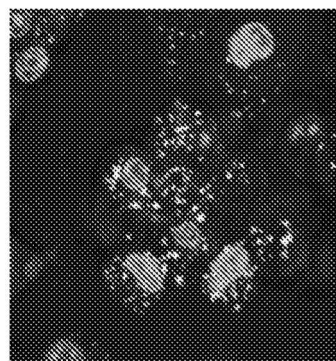


FIG. 6A

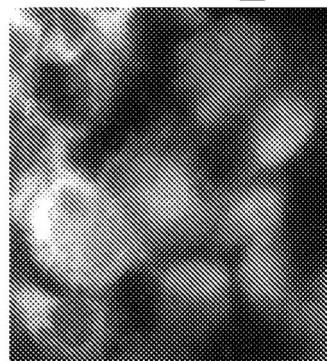
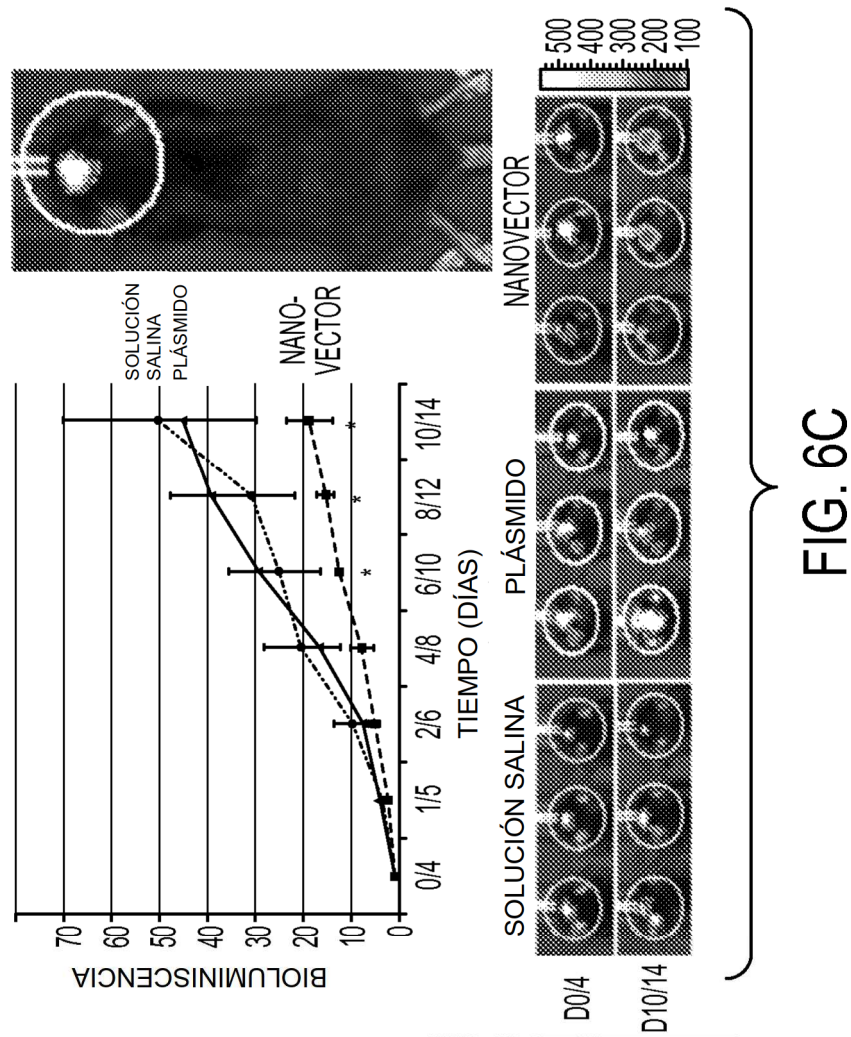


FIG. 6B



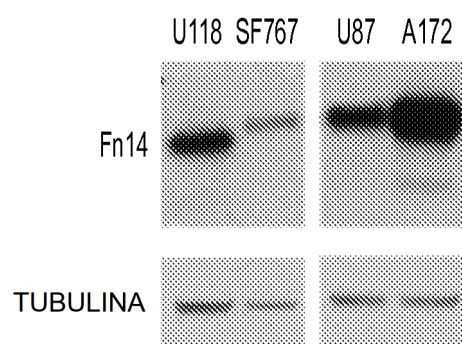


FIG. 7

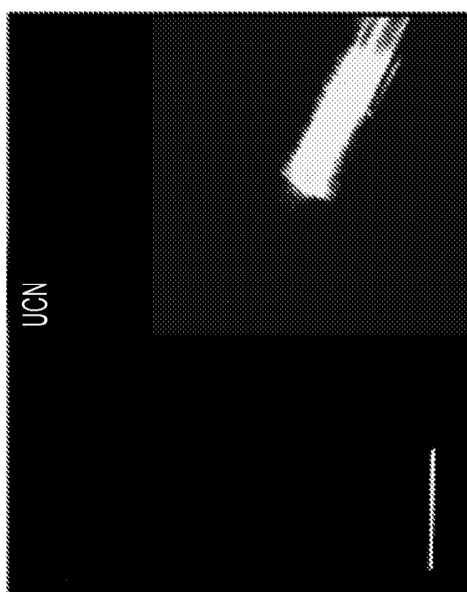


FIG. 8A

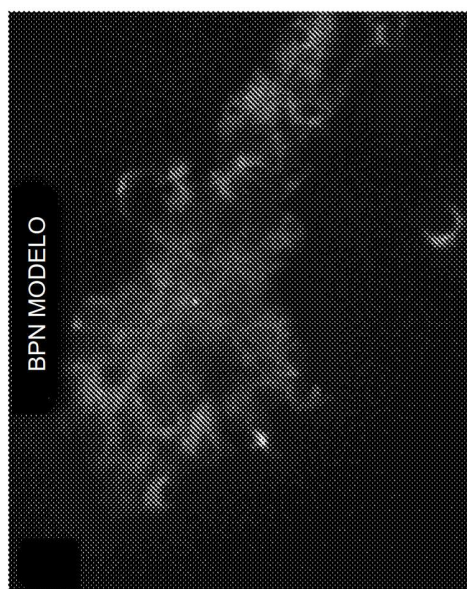


FIG. 8B

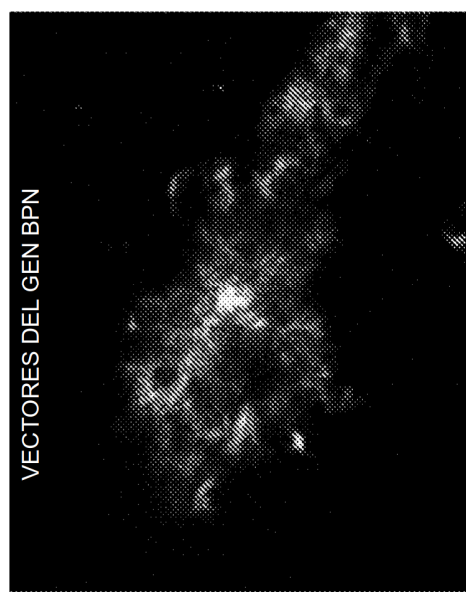


FIG. 8C

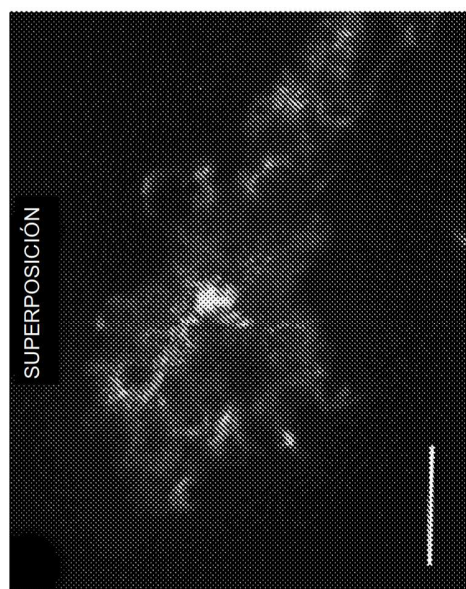
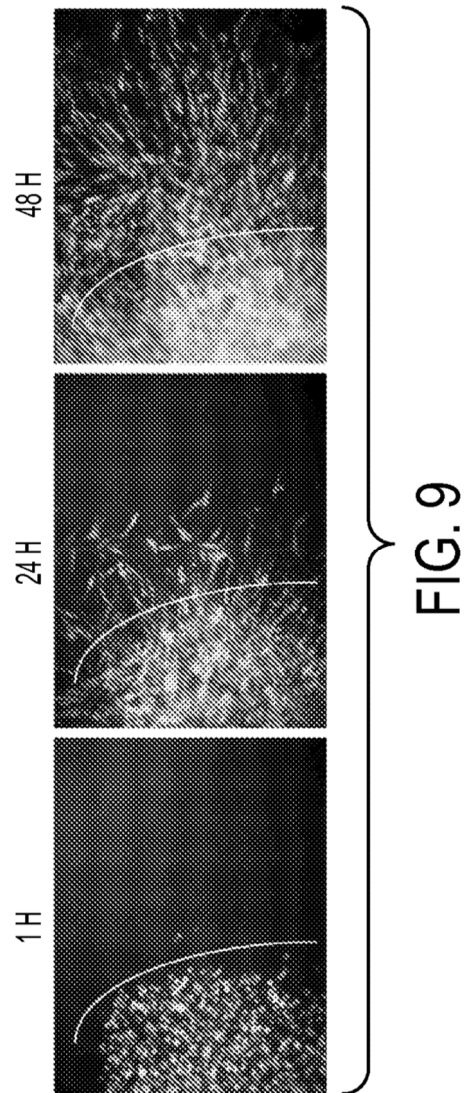


FIG. 8D



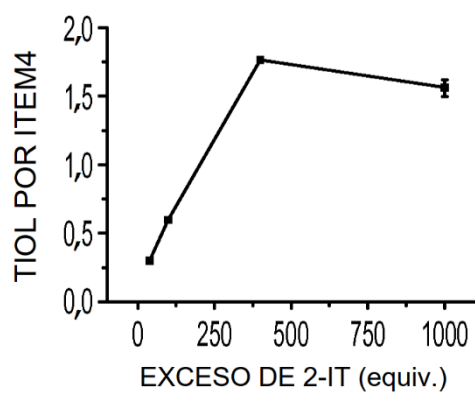


FIG. 10A

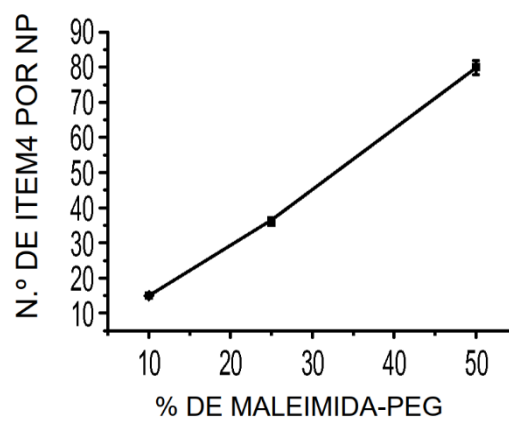


FIG. 10B

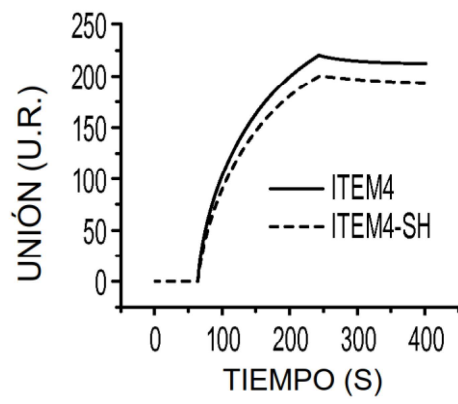


FIG. 11A

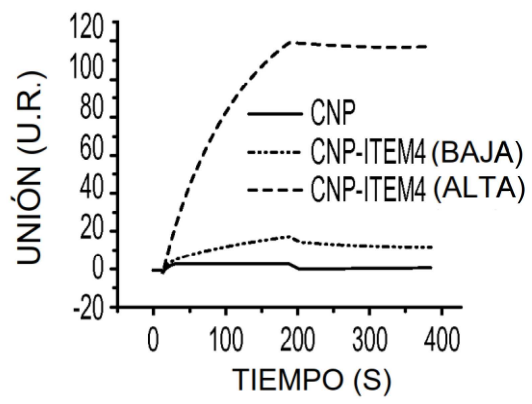


FIG. 11B

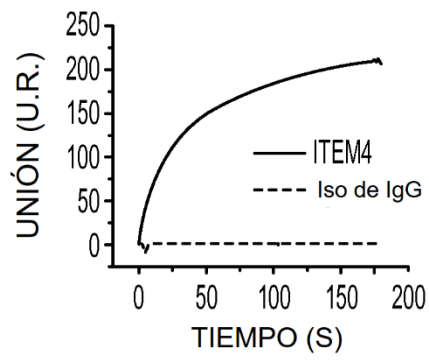


FIG. 12A

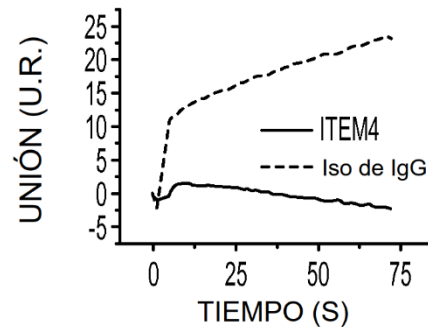


FIG. 12B

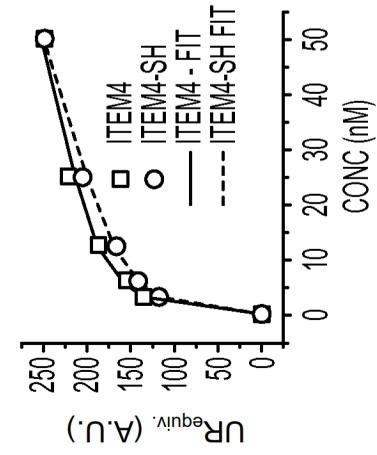


FIG. 13C

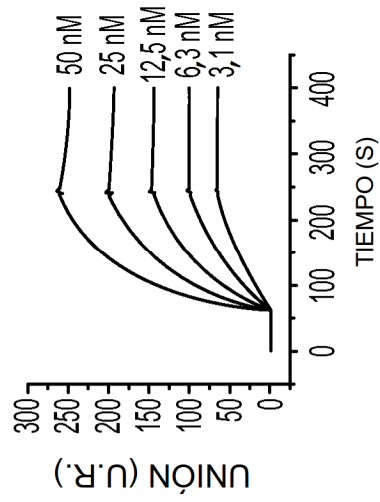


FIG. 13B

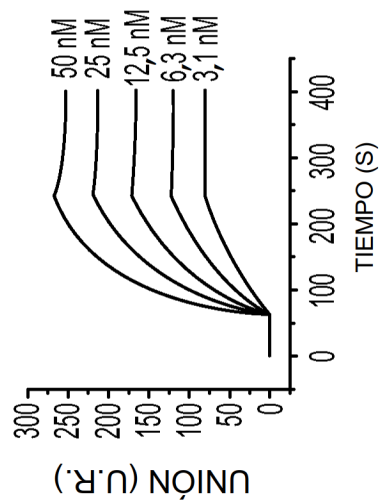


FIG. 13A

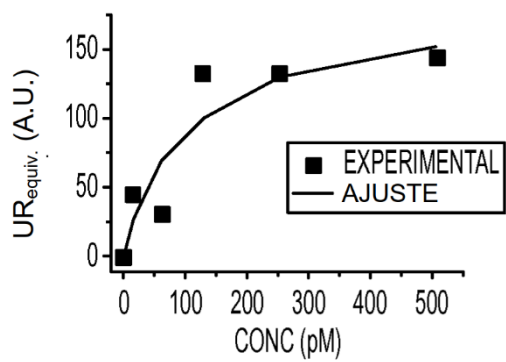


FIG. 14A

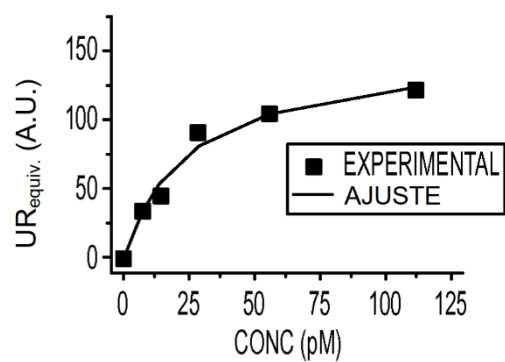


FIG. 14B

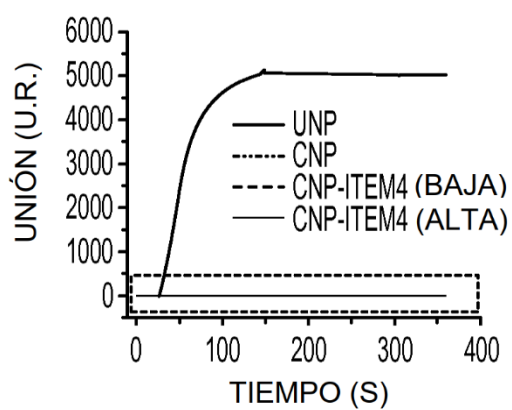


FIG. 15A

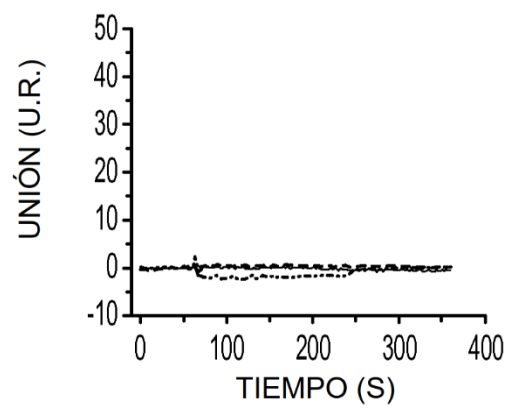


FIG. 15B

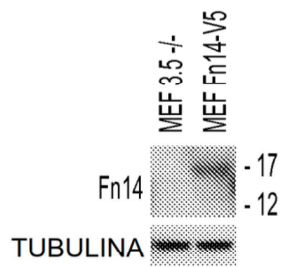


FIG. 16A

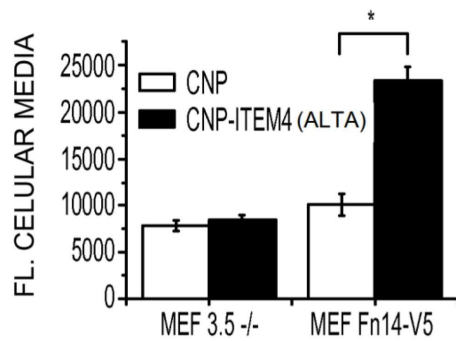


FIG. 16C

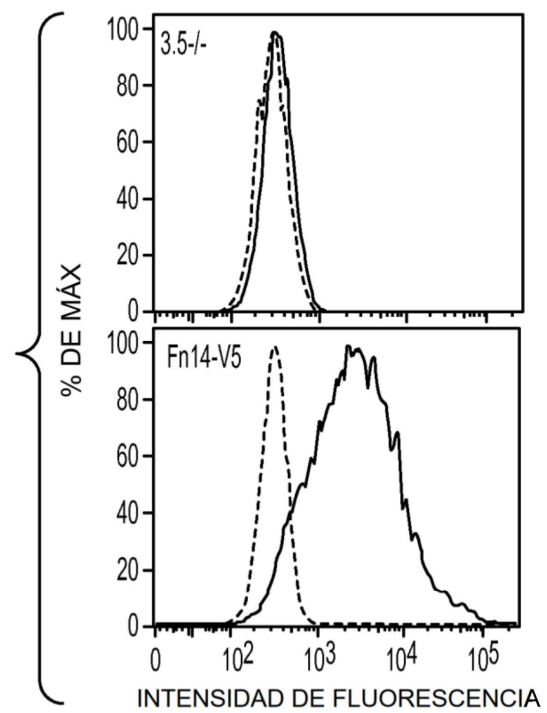
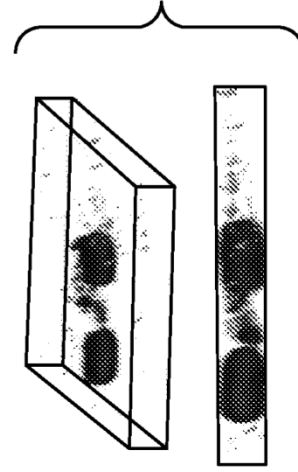
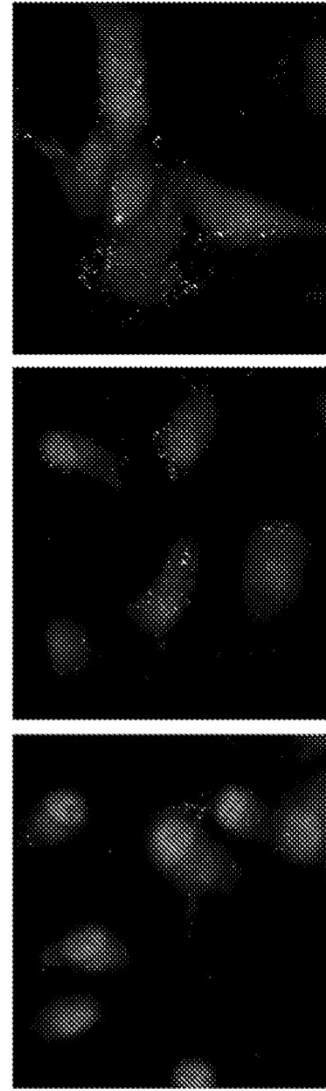
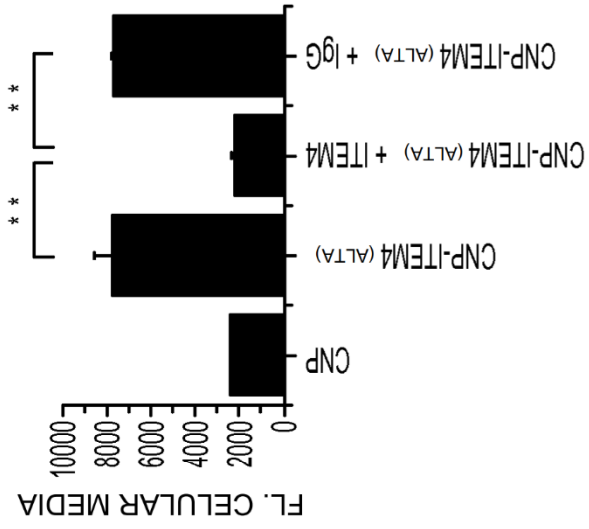
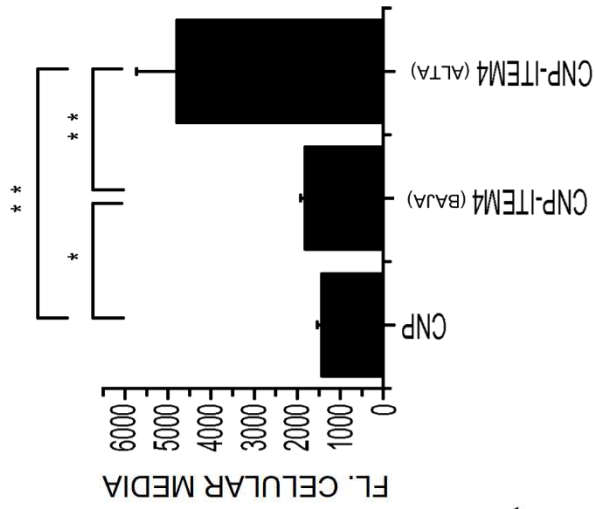
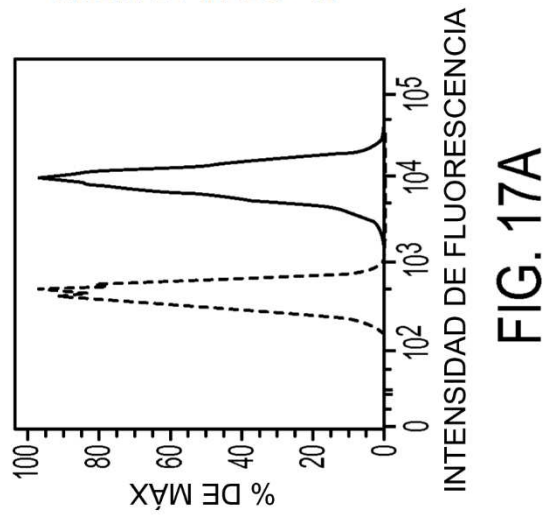


FIG. 16B



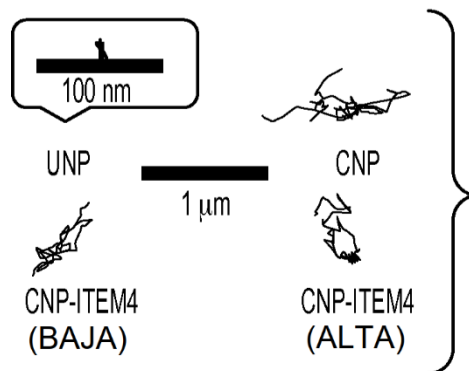


FIG. 18A

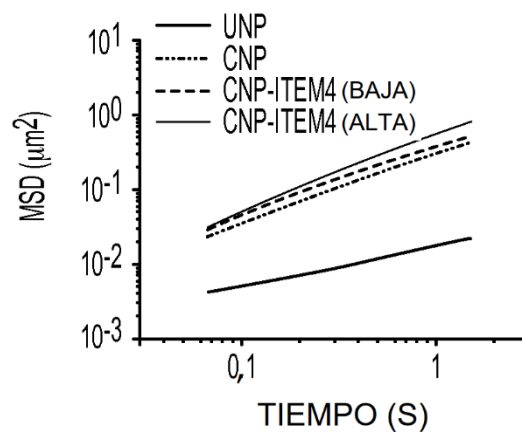


FIG. 18B

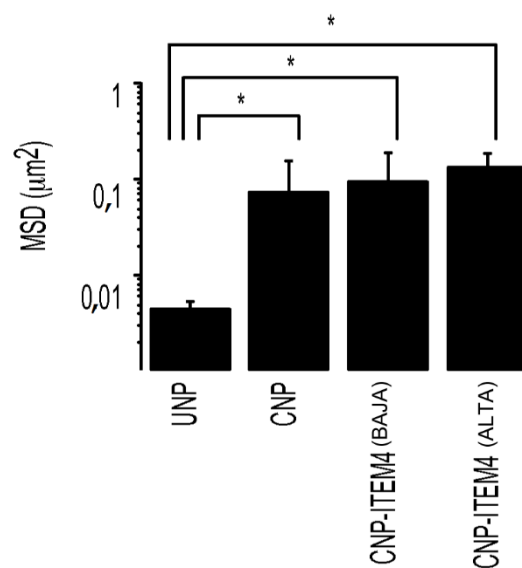


FIG. 18C

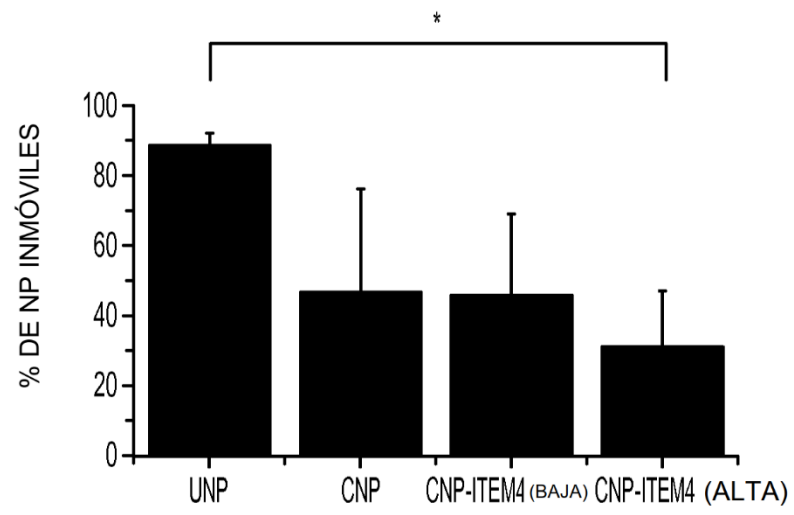


FIG. 19

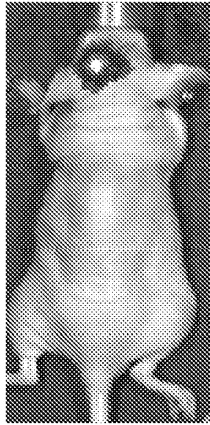


FIG. 20A

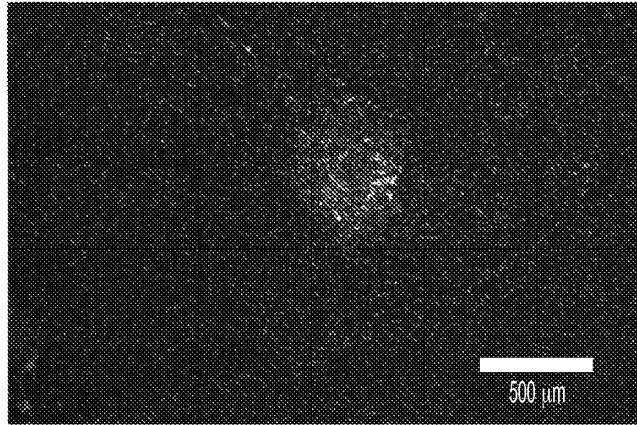


FIG. 20B



FIG. 21A

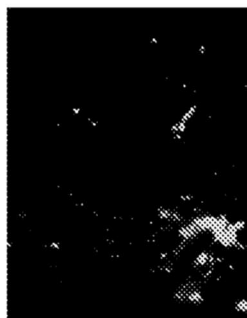


FIG. 21B



FIG. 21C

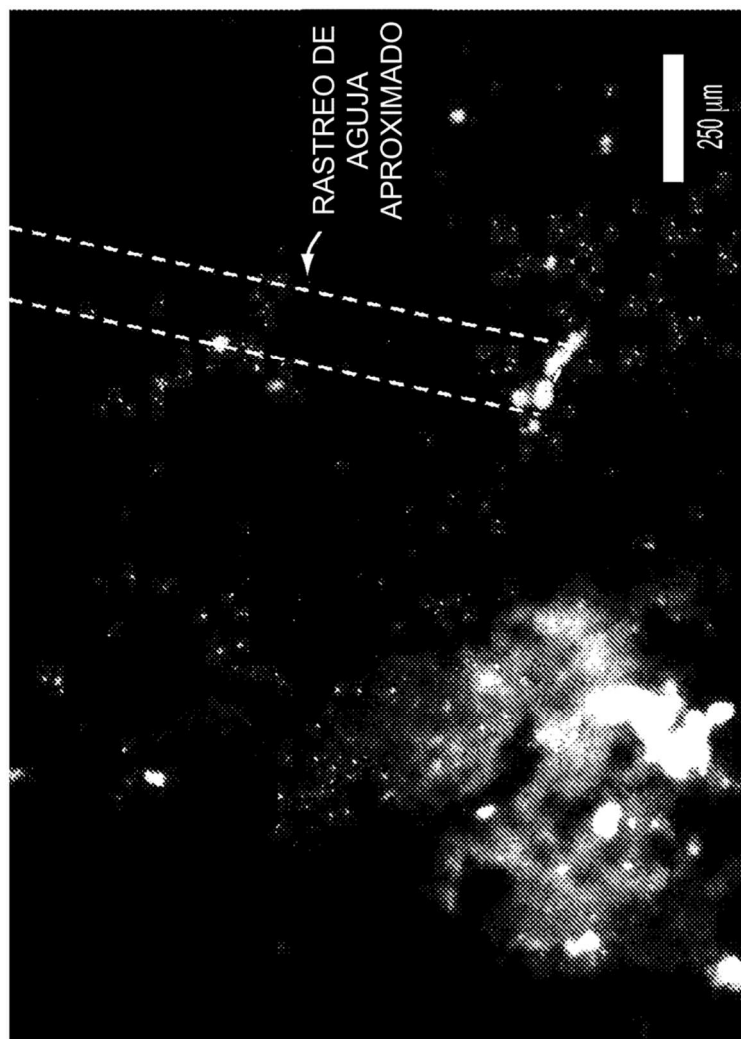
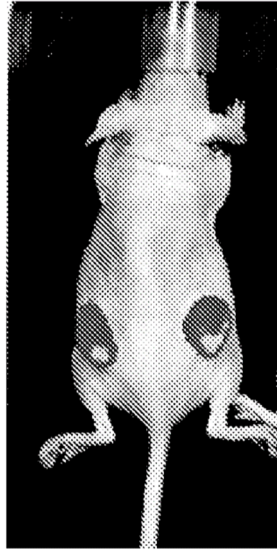


FIG. 21D

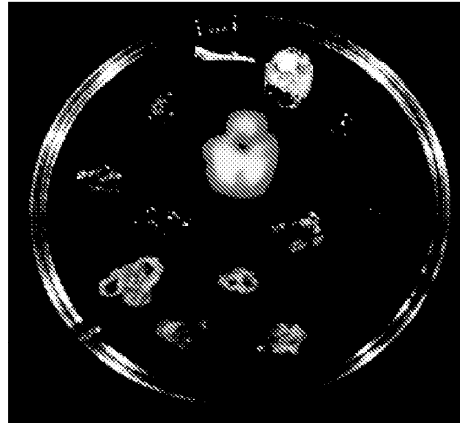


PS-PEG_o PS-PEG-ITEM4

FIG. 22A

PS-PEG

FIG. 22B



PS-PEG-ITEM4

FIG. 22C

